



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsovetenskap

# **Markörer för inflammation och smärta i serum och ledvätska hos halta hästar – en pilotstudie**

*Caroline Hultqvist*

*Uppsala  
2017*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2017:59*



# Markörer för inflammation och smärta i serum och ledvätska hos halta hästar, en pilotstudie

## Potential biomarkers of inflammation and pain in serum and synovial fluid from clinical lame horses, a pilot study

*Caroline Hultqvist*

**Handledare:** Maria Löfgren, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Biträdande handledare:** Stina Ekman, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Marie Rhodin, institutionen för kliniska vetenskaper

**Examinator:** Karin Vargmar, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

*Examensarbete i veterinärmedicin*

*Omfattning: 30 hp*

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0751

*Utgivningsort: Uppsala*

*Utgivningsår: 2017*

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2017:59

**ISSN:** 1652-8697

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** häst, osteoartrit, NGF, interleukin-6, smärta, substans P, ekvin, leder, synoviala strukturer

**Key words:** horse, osteoarthritis, NGF, interleukin-6, pain, substance P, equine, joints, synovia

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## **SAMMANFATTNING**

Osteoartrit (OA) är en ofta förekommande orsak till hältor hos häst. De tidiga leddskadorna vid OA inkluderar ledinflammation och nedbrytning av ledbrusket. De strukturella leddskador som kan påvisas radiologiskt uppstår inte förrän sent i sjukdomsförloppet när en irreversibel vävnadsskada hunnit utvecklas. Därför finns ett behov av diagnostiska verktyg som upptäcker leddskadan tidigare. Än så länge finns ingen biomarkör för tidigt stadium av OA hos häst. Nerve Growth Factor (NGF), Interleukin-6 (IL-6) och substans P (SP) är alla potentiella biomarkörer avseende smärta och inflammation vid OA. Syftet med denna studie är att undersöka om dessa går att mäta i ledvätska och serum och se om något samband finns mellan hälta och koncentration.

I studien ingick 14 hästar, med ledvätska insamlat från flera leder i åtta av dessa. Totalt ingår 23 prover ledvätska och 10 prover serum. Samtliga prover samlades in från hästar som objektivt med dataprogrammet Qualisys och subjektivt av ortopediskt erfaren veterinär konstaterats halta. Med hjälp av ledanestesi kunde lederna klassificeras som hältutlösande eller inte. Koncentrationerna av NGF, IL-6 och SP i serum och ledvätska analyserades med ELISA. Samtliga tre biomarkörer kunde mätas i både ledvätska och serum med kommersiell ELISA. Däremot gick det inte att se några samband mellan koncentrationerna av biomarkörer och om leden var hältutlösande eller inte. Ytterligare studier med fler individer inkluderande en frisk kontrollgrupp fordras för att eventuella samband mellan hälta och koncentrationer av dessa biomarkörer i ledvätska och serum ska kunna utredas.

## SUMMARY

Equine lameness is frequently caused by osteoarthritis (OA), with a low-grade joint inflammation. The early joint damage includes articular cartilage destruction and synovitis that cannot be detected radiologically. Radiographic lesions with structural bone lesions can be seen in later stages when the OA changes has progressed during a longer time. Therefore, there is a need for diagnostic biomarkers that can detect the joint lesions earlier. Today, there is no diagnostic biomarkersc for the early stages of equine OA. Nerve Growth Factor (NGF), interleukin-6 (IL-6) and substance P (SP) are all potential biomarkers for pain and inflammation related to early OA. The purpose of this pilot study is to investigate whether they can be measured in synovial fluid and serum by the aid of commercial ELISA and if the concentrations of the biomarkers are related to lameness.

The study included 14 horses, with synovial fluid samples from multiple joints in eight of these. In total the study includes 23 synovial fluids and 10 serum samples. All samples were collected from horses examined for lameness objectively with the Qualisys software and subjectively by veterinarians with orthopaedic experience. Intraarticular anaesthesia was used in order to detect the joint responsible for the clinical lameness. The joints were classified as “responsible for the lameness” or “not responsible for the lameness”. Measurable concentrations were obtained in the commercial ELISA for all three biomarkers. However, the material was too small to detect any relation between the biomarker concentrations and if the joint was responsible for the clinical lameness or not. Studies with a larger group of individuals, including a healthy, non lame control group are needed to evaluate if NGF, SP or IL-6 are potential biomarkers for pain and inflammation in the equine joint.

## INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturstudie .....	2
Frisk led .....	2
Osteoartrit .....	4
Smärta .....	6
Diagnos av OA .....	8
Biomarkörer .....	11
Material och metoder .....	12
Material .....	12
Metod .....	12
Resultat .....	15
Diskussion .....	24
Referenslista .....	27
Bilagor .....	1
Bilaga 1.1 .....	1
Bilaga 1.2 .....	3
Bilaga 1.3 .....	5

## INLEDNING

De vanligaste orsakerna till utslagning bland svenska hästar sammanställdes 2005 med hjälp av Agrias databas (Penell *et al.*, 2005). Nästan en tredjedel av Sveriges hästpopulation ingick, och utgjorde en heterogen grupp med stor variation av raser och där hästarna hade många olika användningsområden. Den vanligaste angivna orsaken till utslagning var ledsjukdom, där data var inhämtad från över 70 000 hästar under fyra års tid. Bland alla diagnosticerade sjukdomar hade artrit i kotleden högst prevalens. Dödligheten för diagnosen var enligt uppgift 28 %.

Osteoartrit (OA) är en av de vanligaste sjukdomarna i hästens rörelseapparat. (Sutton *et al.*, 2009; van Weeren & Back, 2016). OA är en mycket vanlig orsak till smärta och nedsatt funktion, och en väldigt kostsam sjukdom inom hästsporten. Hos äldre hästar (>15 år) är det så frekvent att över 50 % har någon grad av OA (van Weeren & Back, 2016). Studier har visat att ca 60 % av alla hältor hos häst är kopplad till någon grad av OA. Kliniskt manifesterar sig sjukdomen som olika grader av hälta, ökad svullnad i anslutning till lederna, böjprovsreaktioner samt ökad ledfylldhet (McIlwraith *et al.*, 2012; Kidd *et al.*, 2001).

Forskarnas fokus har förskjutits från när sjukdomen ses kliniskt och behandlingsstrategier mot prevention och tidig upptäckt (Glyn-Jones *et al.*, 2015). En av de stora svårigheterna med att upptäcka sjukdomen tidigt är att smärta och grad av strukturell förändring i leden inte alltid korrelerar (Perrot, 2015). Detta innebär att när symptom väl uppstår har sjukdomsförloppet ofta gått långt. Förhoppningen är att framsteg i både bildiagnostik och biomedicinska markörer ska leda till säkrare och tidigare diagnos och därigenom i förlängningen leda till nya behandlingsmetoder.

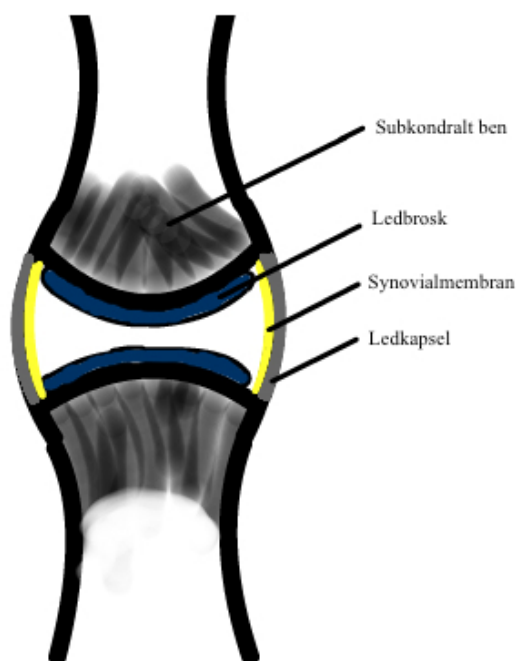
I dagsläget finns det ingen fastställd markör som enskilt kan klassificeras som diagnostisk för tidigt stadium av OA hos hästar. (Frisbie *et al.*, 2016). Syftet med denna studie är att se om nerve growth factor (NGF), substans P (SP) och interleukin (IL)-6 är fungerande biomarkörer för smärta och inflammation vid hälta hos häst.



## LITTERATURSTUDIE

### Frisk led

Det finns tre typer av leder som beroende på funktion är indelade i fibrösa, brosk eller synoviala leder (Dyce *et al.*, 2010). Synoviala leder har vätskefyllda håligheter och gränssytor täckta av hyalint brosk, och en fibrös ledkapsel som utlinjeras av synovialmembran. Under kommande texter i detta arbete är det synoviala leder som avses med ordet leder. En led består inifrån och ut av: hålrum fyllt med ledvätska, synovialmembran, ledyta bestående av ledbrosk, subkondralt ben samt omgivande mjukvävnader (Figur 1.) (Dyce *et al.*, 2010; Caron, 2011; Sutton, *et al.*, 2009).



Figur 1. Schematisk bild över anatomisk uppbyggnad av en synovialled enligt beskrivningar av Dyce *et al.*, 2010; Caron, 2011 och Sutton *et al.*, 2009.

Synovialmembranet består av vaskulär bindväv med två lager med celler, den synoviala intiman och subsynovialt stroma (Sutton *et al.*, 2009). Den synoviala bindväven har varken epitelceller eller basalmembran som separerar ledens håligheter från de synoviala kärlen, istället fungerar intiman och stroma tillsammans som ett makromolekylärt filter (Caron, 2011; Sutton *et al.*, 2009). Den synoviala intiman linjeras av synoviocyter, som bland annat syntetiserar en mängd olika lösliga mediatorer vid inflammation och skada (t.ex. IL-1, prostaglandin E2 och proteinaser). Djupt i den subsynoviala vävnaden är blodutbytet stort, vilket är viktigt för bildandet av ledvätska, utbytet av näring samt bortförandet metaboliska slaggprodukter från de synoviala vävnaderna.

Ledytan i synoviala leder utgörs av ledbrosk som täcker det subkondrala benet. Ledbrosket förhindrar friktion och tillåter en simultan rörelse och viktbarighet utan skador (Caron, 2011). Beroende på vilken led som undersöks kan ledbrosket vara över två mm tjockt (Lee *et al.*, 2014). Hos unga hästar har brosket en elasticitet som successivt försämras med åldern (Dyce *et al.* 2010). Ledbrosket består av kondrocyter omgivna av extracellulär matrix. Ledbroskets extracellulära matrix består till största delen av kollagen typ II, proteoglykanen aggrecan och vatten (Van Weeren, 2016; Caron, 2011; Sutton *et al.*, 2009). En mindre del av broskets komponenter utgörs av olika tillväxtfaktorer, andra typer av kollagen och andra mindre proteiner så som; 'cartilage oligomeric matrix protein' (COMP), lubricin, decorin, biglykan, fibromodulin och fibronectin. Kollagen typ II bildar tillsammans med de andra komponenterna ett nätverk som ger ett stöd och draghållfasthet och aggrecan ansvarar för broskets elasticitet (Van Weeren, 2016; Glyn-Jones *et al.*, 2015). Till skillnad från övriga strukturer i leden saknar ledbrosket både blodkärl och innervering. Brosket får istället sin näring via ledvätskan.

Ledvätska möjliggör ledytornas friktionsfria rörelse mot varandra. Genom effektivt utbyte av näring och slaggprodukter via det synoviala stromat sköter det även broskets rening och näringstillförsel. Utbytet sker via vätskans förflyttning, som sker både genom diffusion men också genom dynamiska förändringar mellan vila och arbete i leden (Van Weeren, 2016; Caron, 2011). Förflyttningen av ledvätska vid kompression och extension tros vara central hos ledbroskets kapacitet att dämpa och utjämna kompressioner samt för ledens friktionslöshet (Caron, 2011). Ledvätskan består av ett filtrat av blodplasma som filtreras genom det synoviala membranet. Vätskan innehåller bland annat lubricin, hyaluronan och kondroitinsulfat (Sutton *et al.*, 2009; Steel, 2008). Detta skapar tillsammans med membranet ett effektivt filter som tillåter fri passage av mindre molekyler, såsom elektrolyter och glukos. Därmed är ledens koncentration av mindre molekyler utifrån liknande den i serum och plasma. Större molekyler blir kvar i ledvätskan.

Subkondralt ben är både biokemiskt och histologiskt likt skelettet i resten av kroppen (Hvid, 1988: se Caron, 2011). Den subkondrala benplattans struktur är dock specifik för denna vävnad. Det haverska systemet har en riktning parallell med ledytorna istället för längs längdaxeln i skelettet och benplattan är tunnare än kortikalt ben längs diafyserna. Strukturen och uppbyggnaden av subkondralt ben är varierande mellan olika leder, skillnaderna representerar de biomekaniska krafterna och de olika ledernas adaptation till rörelse (Simkim *et al.*, 1991). Subkondralt kortikalt och epifysealt trabekulärt ben har större utrymme för deformation än det kompakta benet i diafyseala rörbenen.

Den periartikulära mjukvävnaden består av muskler, ligament, ledkapsel och senor (Kawcak, 2016a; Caron, 2001). Musklerna ger rörelse, men främst ledstabilitet. Senor fungerar som en

bro mellan muskler och ben och ligament ger stabilitet mellan benen som en led består av. Ligament och senor är uppbyggda på snarlika sätt men är ej identiska. Båda består främst av vatten, kollagen typ I och en liten andel fibroblaster. Ligament består av större andel elastinfibrer och har större elasticitet än senor. Den viktigaste gemensamma egenskapen är dock att båda stimuleras av rörelse och bryts ned samt försvagas då de ej utsätts för rörelse (Gamble *et al.*, 1984; se, Caron, 2011).

Ledkapseln är ännu en struktur som liknar ligament (Kawcak, 2016a; Caron, 2011). Vissa ligament kan till och med kännas igen som hypertrofierade delar av ledkapsel. Denna vävnad har som funktion att skapa stabilitet, men dess specifika egenskaper varierar beroende på vilken led i kroppen som undersöks, samt ledens position.

### **Osteoartrit**

OA defineras som en obalans mellan nedbrytande och uppbyggande processer i leden (Caron, 2011; Kidd *et al.*, 2001; Frisbie *et al.*, 2016). Sjukdomen kan klassificeras i 3 typer som anses vara relaterade till etiologin. Typ 1, primär OA, är uppkommen utan fastställd föregående orsak. Typ 2, sekundär OA, är tydligt kopplad till någon form av trauma eller ledskada. Typ 3, icke progressiv ledbrosskada, vilket innebär att en skada på brosket finns men inte har klinisk relevans.

Idag sägs det generellt att det finns tre patogenetiska vägar för OA. Sammanfattat är de tre patologiska teorierna: onormalt ledbrosk, mikrofrakturer på det subkondrala benet och akut trauma eller upprepat mikrotrauma i led/ledbrosk. (Kawcak 2016b; Caron, 2011; Kidd *et al.*, 2001). Det onormala ledbroskets struktur och matrix klarar inte av de mekaniskt normala påfrestningar en frisk led utsätts för. Utöver ledbrosket bidrar det subkondrala benet och periartikulära vävnader till ledens stötdämpning. Vid kraftig frekvent mekanisk belastning av subkondralt ben uppstår upprepade mikrofrakturer. Om mikrofrakturer uppstår i en ökad frekvens kan det överstiga benets möjlighet till läkning och istället ge upphov till ett tätare ben (benskleros) som därmed blir sämre på att dämpa stötar och då kan skadas ännu mer under normal mekanisk belastning. Ett akut trauma eller upprepat mikrotrauma kan också ge upphov till skada på friskt ledbrosk, då den mekaniska belastningen tillsammans med en tidig inflammation i leden startar en broskdestruktion. Skador på matrix- eller cellnivå orsakar metaboliska förändringar inkluderande en inflammation och nedbrytning av ledbrosket. Ett ensamt akut trauma orsakar sällan allvarlig skada då ledbrosk är en mycket tålig vävnad. Flera upprepade mikrotrauman, t.ex. hård enformig träning under lång tid, har visat sig predisponera för OA.

OA är en kronisk sjukdom där broskkomponenter, främst broskspecifika proteoglykaner och kollagen typ II bryts ned (McIlwraith *et al.*, 2012). Detta i och med att balansen mellan anabola

och katabola processer i extracellulär matrix har förändrats. Studier har visat att ledvätska har en viktig roll i patogenesen vid OA och att synovit har en signifikant roll i smärtan, ledinflammationen och brosknedbrytningen som ses vid OA (Sutton *et al.*, 2009). Den akuta synoviten kan vara en av de första märkbara förändringarna i leden som sker vid OA. Det har visats att synovial vävnad från patienter med tidigt stadiet av OA har en överproduktion av inflammatoriska mediatorer som pro-inflammatoriska cytokiner. Synoviocyter, migrerande leukocyter och kondrocyter stimuleras av dessa cytokiner till att frigöra matrix metalloproteinaser (MMPs) och lysosomala enzymer (Kidd *et al.*, 2001). I förlängningen leder detta till nedbrytning av ledbroskets komponenter. SP, en neuropeptid i ledvätska, både driver inflammationen och bidrar till överföringen av smärta (Sutton *et al.*, 2009; de Grauw, 2006). Studier har visat att MMP-13, MMP-2, MMP-3 och MMP-9 ökar i aktiv form både i ledvätska och ledbrosk vid OA jämfört med normala leder (Yui *et al.*, 2016; McIlwraith *et al.*, 2012, Sutton *et al.*, 2009). Därmed uppges ett samband finnas mellan MMPs, inflammation och smärta.

Många studier har visat cytokiners involvering i patogenesen vid OA (Sutton *et al.*, 2009). De viktigaste cytokinerna är proinflammatoriska IL-1 $\beta$  och tumor necrosis factor-alfa (TNF- $\alpha$ ) samt regulatoriska IL-6. De förknippas bland annat med brosknedbrytning (Bertone *et al.*, 2001). Cytokinerna är också involverade i synovial metabolism. IL-1 $\beta$  är direkt kopplad till inflammation vid OA och anses vara den mest aktiva cytokinen. En studie har visat att en IL-1 $\beta$  receptor antagonist har lyckats inhibera utvecklingen av OA och minska smärtan i samband med sjukdomen (Frisbie *et al.*, 2002). En rådande hypotes är att en stor del av cytokiners inblandning initialt är igångsatt av de synoviala strukturerna. Efter en migration från ledvätskan till ledbrösket driver de på och stimulerar cytokinbildning och degenerativa proteaser hos både kondrocyter och synoviocyter. TNF- $\alpha$ , en cytokin som stimuleras av bland annat IL-1 $\beta$  finns i ökade koncentrationer i ledvätskan hos patienter med reumatisk artrit och OA (Séguin & Bernier, 2003). TNF- $\alpha$  ökar produktionen av olika MMPs och driver den lokala inflammationen, och har även en hämmande verkan på kollagenuppbyggnad i ledbrösket.

Interleukin (IL)-6 IL-6 är ett regulatoriskt cytokin vid OA även om dess exakta roll inte är klarlagd. IL-6 stimulerar bland annat produktionen av metalloproteinas inhibitorer (TIMP). Synoviocyter och kondrocyter står för utsöndring av IL-6 som påverkar proteoglykansyntesen negativt, minskar kondrocyternas proliferation, ökar aktiviteten av MMP-2 och aggrecanas-medierad katabolism av proteoglykaner (Sutton *et al.*, 2009). En studie har indikerat att IL-6 endast gick att upptäcka i ledvätska från leder med inflammation och att det därmed är en cytokin som har mycket goda utsikter för att användas som markör för inflammation (Bertone *et al.*, 2001). IL-6 produktionen sätts igång via frisättningen av IL-1 $\beta$ . IL-6 påvisades i synoviocyter och kondrocyter samt ledvätska i leder med osteokondrala fragment men inte i friska leder från häst (Ley *et al.*, 2009).

OA är den vanligaste orsaken till hälta hos häst (Van Weeren & Back, 2016). Ett stort problem för diagnostik och prognos är att graden av smärta och graden av ledskada inte korrelerar (Perrot, 2015). Brosket är en av de vävnader som affekteras först i leden, med då det saknar nerver anses smärtsymptom inte registreras vid enbart skada på ledbrosket. Smärta som resulterar i en klinisk hälta är oftast kopplad till involveringen av periartikulära vävnader, såsom subkondralt ben och mjukvävnader. Vid det laget kliniska symptom uppstår har homeostasen i leden påverkats med övervägande katabola processer i ledbrosket. Det involverar en låggradig inflammation med ökad mängd ledvätska vilket resulterar i en synlig eller palpabel svullnad vid leden (galla) (Caron, 2011). På grund av ökad permeabilitet i de synoviala vävnaderna fås ett proteinläckage till det synoviala hålrummet i leden. Detta ger ett ökat kolloidalt osmotiskt tryck och tilltagande volym hos ledvätskan. Vid längre pågående processer kan graden av hälta inte stämma överens med den strukturella skada som finns i lednära vävnader (Van Weeren, 2016). Orsaken till detta är att med tiden degenereras neuronerna och innervationen i ledkapseln minskas. En vanlig klinisk manifestation av OA är ofta att hästen under tid visat en långsamt ökande hälta som ofta kan vara bilateral (Kidd *et al.*, 2001). Minskat rörelseomfång, range of motion, är vanligt hos hästar med OA och härstammar troligen från flera faktorer i kombination, ökad mängd ledvätska, svullnad av periartikulära vävnader och tidigare smärta från leden gör hästen ovillig att böja affekterad led (Kidd *et al.*, 2001; Caron, 2011).

## Smärta

Den allmänt vedertagna definitionen av smärta anges på *International Association for the Study of Pain (IASP)* hemsida. Den lyder som följer: "Pain An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage." Smärta med påföljande hälta är ett av huvudsymptomen vid OA (Perrot, 2015). Studier har visat att det sker en sensitisering både lokalt, perifert i leden samt centralt i hjärnan vid OA. De lokala reaktionerna kommer tidigare i det akuta skedet. Centralt sker sensitiseringen vid kroniska tillstånd. I en studie upptäcktes att nociception från strukturer i leden, ledkapsel, subkondralt ben och inflammationen i synoviala strukturer, orsakade smärta mer centralt och i vävnader ej direkt kopplade till leden (Arendt-Nielsen *et al.*, 2010). Som tidigare nämnt är det inte det aneurala ledbrosket som är orsaken till smärta vid OA (Dieppe & Lohmander, 2005). Det är de kraftigt innerverade periartikulära vävnaderna som tros vara involverad i nociceptionen vid OA. Studier har visat en korrelation mellan förändringar i subkondralt ben och/eller synovit och smärta (Dieppe & Lohmander, 2005). I en klinisk studie påvisades signifikanta skillnader i smärtupplevelse och duration hos patienter med OA jämfört med friska kontroller (Bajaj *et al.*, 2001).

**Neurotransmittorn substans P (SP)** har visats vara både proinflammatorisk och ha en aktiv roll i smärtsensibiliteten (Kidd *et al.*, 2001). SP är en neurotransmittor som finns i omyeliniserade nerver och som är involverad i fortplantningen och överföringen av smärta

(Kirker-Head *et al.*, 2000; Caron, 1992). Det är en neuropeptid som finns generellt spritt i nervsystemet. Den utsöndras från neuron som en respons på inflammatoriska och traumatiska stimuli (Sutton *et al.*, 2009; Kirker-Head *et al.*, 2000; Caron, 1992) SP tros ha en förstärkande effekt på skadeutveckling vid ledpatologier och bidra till utvecklingen av OA, även om mekanismerna bakom detta är okända (Inoue *et al.*, 2001; Kirker-Head *et al.*, 2000). I tester där SP tillförts till leder har synoviocyternas prostaglandinproduktion och inflammationen ökat. Hos hästar är de synoviala membranerna innervade av nervterminaler som innehåller SP och mängden av neuropeptiden ökar påtagligt i inflammerad ledvätska (Hardy *et al.*, 1998, se: Kirker-Head *et al.*, 2000). En potentiell teori är att SPs påverkan på synoviala celler ger en frisättning av cytokiner som stimulerar nybildning av osteoklaster (Matayoshi *et al.*, 2005), och därmed en nedbrytning av subkondralt ben. Teorin kommer från resultatet i studien, där ökade nivåer av cytokinen receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) mRNA visades vara stimulerad av SP. RANKL driver på differentieringen av osteoklaster.

SP och dess fragment påverkar kondrocyter direkt och förändrar både konduktans av kalium och mobiliserar kalcium (Sutton *et al.*, 2009). Teoretiskt sett förväntas dessa förändringar ändra membranpotentialen hos kondrocyter, men det har ej fastställts. Denna hypotes innebär att kondrocyternas funktion direkt påverkas av SP. SP initierar frisättning av prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) från kondrocyter, och med hästen som modell har ett signifikant samband mellan de två uppmätts i ledvätska (Kirker-Head *et al.*, 2000). SP aktiverar också flera sorters vita blodkroppar, bland annat de makrofager som finns i ledvätskan till följd av synovit. Neurotransmittorn stimulerar också kollagenas- och  $PGE_2$ -frisättning av synoviocyter (Sutton *et al.*, 2009; Matayoshi, 2005) och studier på människa har visat att blodcellerna stimuleras till att frigöra IL-6. Det anses också högst troligt att SP är involverat i den akuta inflammationen i ett mycket tidigt skede då den driver på frisättningen av IL-1 $\beta$  och TNF- $\alpha$  som båda är aktiva under den tidiga inflammationen (Sutton *et al.* 2009).

Förhöjda nivåer av SP i ledvätska från leder med positiv avläsning av ledanestesi jämfört med friska leder påvisades hos häst (De Grauw *et al.*, 2006). Trots att  $PGE_2$  har en nära relation och påverkas av SP-nivåerna i leden visade den studien att SP-nivåerna var signifikant förhöjda i leder med ledsmärta utan radiologiska förändringar, men en signifikant ökning av  $PGE_2$  saknades. En hypotes gällande detta avvikande resultat jämfört med andra studier är att  $PGE_2$ , som visats korrelera med SP, kanske snarare är relaterat till ledpatologier av olika slag än ledsmärta i sig.

**Nerve Growth Factor (NGF)** är ett protein som produceras av bland annat synoviala fibroblaster. Studier har visat att proteinet syntetiseras i större mängder vid en inflammation. NGF-produktionen kan stimuleras av flera olika cytokiner, såsom TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , och IL-6. NGF ökar nedbrytningen av normal ledvävnad. Detta genom att stimulera migration av neutrofiler och deras degranulering. Det ger en ökad mängd elastin i leden vilket driver

nedbrytningen av normal ledvävnad. NGF uttrycks både av celler som tillhör nervsystemet och icke-neurala celler. De icke-neurala celler som producerar NGF uttrycker även en receptor som NGF binder in till, tropomyosin receptor kinas A (TrkA). Detta innebär att NGF frigörs och kan utöva sin proinflammatoriska effekt på samma plats. NGF kan lokalt påverka de immunmedierade mekanismer som bibehåller och förvärrar en inflammation (Raychaudhuri *et al.* 2011).

NGF är en viktig signalmolekyl som är involverad i ledsmärta vid OA (Jiang *et al.*, 2015). NGF har två olika receptorer, TrkA som har hög affinitet till NGF och p75 som har låg affinitet (Raychaudhuri *et al.*, 2011). TrkA är den receptorn som är involverad vid NGFs smärtpåverkan. NGF och dess receptorer kan påverka smärta vid OA på två sätt; genom att öka proliferationen av sensoriska neuron eller genom att ändra smärtröskeln via NGF receptorer med hög affinitet (TrkA) som sensitiserar sensoriska neuron (Seidel *et al.*, 2013). NGF är direkt involverad i uppregleringen av TrkA (Kojima *et al.*, 1995, se: Seidel *et al.*, 2013). En hypotes är att ökade nivåer av NGF direkt ger en ökad sensitisering som resulterar i hyperestesi och allodyni (Seidel *et al.*, 2013). NGF och dess receptors roll i patologin vid OA är inte helt utredd men studier tyder på att NGF kan vara involverat i patogenesen vid OA med ledbrusk som målvävnad (Jiang *et al.*, 2015). Exempelvis är ledbrusk immunopositivt för NGF och vid human OA ses högre uttryck av NGF och TrkA.

## Diagnos av OA

Den vanligaste undersökningen i samband med hälta är den subjektiva hältutredningen som veterinärer gör. En hältutredning är generellt relativt standardiserad med klinisk undersökning, rörelsekoll på rakt och böjt spår samt om möjligt på olika underlag. Hältor ses oftast tydligast i kontrollerad trav på rakt spår, där linföraren tillåter fri huvudrörelse. Då traven hos friska hästar har en symmetrisk tvåtakt underlättar det upptäckten av eventuella asymmetrier (Kawcak *et al.*, 2016). Ett av problemen med hältundersökning är att veterinären graderar hältan subjektivt. Studier har visat att det föreligger stor spridning i vilken gradering veterinärer gör av hältor. Detta även om veterinärerna har stor erfarenhet av ortopediska utredningar. Enligt studier är det främst subtila hältor som är under <1.5 grad (AAEP-skalan) där spridningen av gradering och vilket ben som är ursprung till hältan är signifikant (Keegan *et al.*, 2010). Enligt studien är veterinärer endast överens om att det förekommer en hälta tre av fyra gånger vid frambenshältor och två av tre gånger vid bakbenshältor. Behovet av ett mer objektivet sätt att utreda hältor är stort.

Vid en hälta är gold standard att fokus ligger vid huvudets rörelse och bäckenets rörelser. Det är generellt accepterat att en häst vid frambenshäla nickar med huvudet. Vid bakbenshältor utvärderas asymmetrierna främst vid tuber sacrale alternativt tuber coxae vertikala pendelrörelse. Studier har visat att huvudnickningen är direkt relaterad till förändrad acceleration och krafter vid isättande av framhovar (Pfau *et al.*, 2015). Vid en frambenshäla

kommer hästen att sjunka ned mindre med huvudet under belastningsfasen av det halta benet för att avlasta det och sjunka ned mer med huvudet när det friska benet belastas (Buchner *et al.*, 1996). En annan undersökning visar att den bästa metoden för att subjektivt diagnosticera en bakbenshätta är att titta på tuber coxae (May & Wyn-Jones, 1987). Genom att stå rakt bakom hästen och jämföra den pendlande rörelsen mellan det halta benet och det friska kan en asymmetri upptäckas. Tuber sacrale har en mindre vertikal rörelse på sidan för det halta benet då hästen aktivt använder bålen för att minska accelerationen vid rörelse (Buchner *et al.*, 1996). På motsatt sida ses istället en ökad vertikal rörelse då hästen lägger mer tyngd på det friska benet (May & Wyn-Jones, 1987). En svårighet i att diagnosticera bakbenshätta är att en ipsilateral kompensatorisk huvudnickning kan uppstå när hästen avlastar det halta benet. På samma sätt kan en frambenshätta ge endera en kontralateral eller ipsilateral kompensatorisk asymmetri av bäckenrörelserna (Rhodin *et al.*, 2013). Detta innebär att veterinären måste noggrant utvärdera de kliniska fynd som erhålls för att kunna göra en korrekt bedömning av hältans ursprung.

I kliniska situationer används ofta böjprov för att avgöra grad av smärta, lokalisering av hälta samt eventuell ledpatologi (Caron, 2011). Vid extension och flexion förändras volymen inuti en led. Den är som lägst och som störst vid extremiteterna. Hos friska hästar kan en asymmetri induceras av böjproven, men studier har visat att hos friska hästar kommer effekten att avta redan efter två-tre steg (Starke *et al.*, 2015; Dyson, 1997). Volymförändringen i leden är någonting som påverkar hästar med synovial effusion mer (Caron, 2011) vilket ger en fysiologisk grund för att lokalisera en ledpatologi vid böjprov. Försiktighet vid tolkningen av böjprov bör dock vidtas, då böjprovsreaktioner kan ge reaktioner på det belastade benet som respons på den ökade belastningen det innebär att ha det andra benet lyft (Dyson, 1997). Vid 30° flexion tros lederna hos en häst, i likhet med människans knän, ha maximal volym och ett minimum av smärta och intraartikulärt tryck. Trycket i en led varierar vid rörelse, men i vila är det undertryck. Detta innebär att vid vila har leden ett hålrum av undertryck, med ledvätska endast som ett tunt lager på alla strukturer (Caron, 2011).

Flertalet studier har undersökt objektiva mätmetoder för att hitta ett hållbart sätt att undkomma den felmarginal som finns i de subjektiva hältutredningarna (McCracken *et al.*, 2012; Keegan *et al.*, 2011). Tidigare krävdes stora resurser för att göra objektiva mätningar, med utrustning som tryckmattor i golvet, alternativt på rullmattor (Kawcak *et al.*, 2016; McCracken *et al.*, 2012, Keegan *et al.*, 2004). Nuförtiden används främst kinematiska (studier av rörelser) metoder men även kinetiska (studier av krafter) metoder kan användas för objektiv analys av hälta. Rörelser kan mätas med antingen kamerasystem som mäter positioner av markörer som fästs vid hästen eller med sensorer som mäter accelerationer och rotationer som sedan kan räknas om till position. De kinematiska metoderna mäter oftast huvudets, tuber sacrales, tuber coxae och mankens rörelse som har ett sinusformat utseende med den lägsta positionen vid understödsfasen för respektive diagonal i trav och maxposition i svävningsfasen. Sinuskurvan



är ett resultat av de krafter som verkar vid belastningen i samband med benens isättning och frånskjut. När en häst avlastar ett ben pga smärta minskar den krafterna som det benet utsätts för genom att ändra kroppens acceleration (newtons lag  $F=M \cdot A$ ) vilket ger upphov till en asymmetrisk sinuskurva som vi kan mäta.

Hos symmetriska hästar är sinuskurvan jämn och likadan för båda sidor, medan halta hästar får en asymmetrisk kurva, där lägsta och/eller högsta punkt för den halta sidan är förskjuten mot mitten på den vertikala linjen (Fiske-Jackson, 2015; McCracken *et al.*, 2012, Keegan *et al.*, 2011, Keegan *et al.*, 2004). Studier har visat att den objektiva mätmetoden var säkrare än ortopediskt erfarna veterinärers subjektiva bedömning. I över 50 % av fallen valde programmet ut korrekt halt ben innan veterinärerna. Det objektiva systemet kunde också lokalisera hälltän vid signifikant lägre grader av hälla än veterinärerna (Fiske-Jackson, 2015). I en utvärdering av det sensorbaserade systemet jämförde det kamerabaserade systemet kunde det fastställas att båda systemen hade en hög korrelation och signifikant samstämmiga resultat (Keegan *et al.*, 2004). De objektiva systemen kan förutom att lokalisera vilket ben hästen är halt på också användas för att analysera vilken del av rörelsen hästen avlastar belastning eller frånskjut, vilket i framtiden kan ge en indikation på vilken anatomisk struktur hälltän utgår ifrån (Fiske-Jackson, 2015).

Slätröntgen är det främsta bilddiagnostiska verktyget för att diagnosticera OA (Glyn-Jones *et al.*, 2015, Kidd *et al.*, 2001). De vanligaste radiologiska förändringarna är mjukdelssvullnad, subkondral skleros, tätare ledspringor och osteofyter (Kidd *et al.*, 2001). Nackdelen med att använda röntgen jämfört med magnetröntgen (MR) är att broskförändringar inte syns. Detta gör att digital röntgen, trots hög specificitet, har låg sensitivitet (Amin *et al.*, 2005). Risken blir därmed överhängande att fall av tidig OA där broskskador ännu ej utvecklats blir inkorrekt diagnosticerade. I en undersökning upptäcktes att MR är ett signifikant bättre verktyg än slätröntgen för att kunna se osteofyter (Olive *et al.*, 2010). Beroende på vilken sorts MR som används är det också ett viktigt verktyg för att få en bild av ledbrosket och därmed avgöra om förändringar förekommer (Kawcak *et al.*, 2016). MR ger också en tydligare bild av mjukdelsförändringar i och i anslutning till leden. MR är dock väldigt komplicerat på häst, då den har få användningsmöjligheter på grund av hästars storlek. Att undersökningen tar lång tid och att hästen måste vara sövd samt låg tillgänglighet och hög kostnad gör sammantaget att det är en diagnostisk metod som sällan används för OA.

Diagnostiska bedövningar är ett vanligt hjälpmedel för veterinären vid hältutredningar (Pfau *et al.*, 2015). De vanligaste bedövningsmetoderna är ledningsanestesier, infiltrationsanestesier och ledanestesier. Ledanestesi ger ett mer direkt svar om hälltän utgår från undersökt område eller inte. En ledningsanestesi eller infiltrationsanestesi påverkar fler strukturer samtidigt. Det innebär att hältutredningen vid positiv avläsning av en ledningsanestesi har ringat in hältutlösande område. Samtidigt går det inte att avgöra exakt vilken del i området som orsakade

håltan. Normalt sett går diagnostisk håltutredning oftast distalt från hoven och proximalt, detta så att bedövningen inte har oönskad effekt på anatomiska strukturer distalt om applikationsstället, längs med nervtrådar och ger en felaktig avläsning (Bassage & Ross, 2011). Innan avläsning bör det kontrolleras att bedövningen tagit om det är en ledningsanestesi. Främst är målet att blockera initialhåltan inte en eventuell böjprovsreaktion. Det är sällan en 100 % förbättring av håltan erhålls, och en minskning med 70-80 % bör tolkas som ett positivt resultat.

## Biomarkörer

En biomarkör är något som kan mätas objektivt och kan evalueras som en indikator på normala biologiska processer, farmakologiska svar på terapeutiska behandlingar eller indikator på patologiska processer (Frisbie *et al.*, 2016). Det finns flera olika sorters markörer, t.ex. fysiologiska, anatomiska, biokemiska och molekylära parametrar. Beroende på vilken typ av markör som undersöks kan de ge information från endera en enskild led eller kan de representera hela kroppens sammanlagda mängd av just den markören. I dagsläget finns det inte någon markör som på individnivå kan klassificeras som diagnostisk för tidigt stadie av OA hos varken djur eller människor.

Biomarkörer kan karaktiseras på flera olika sätt (Bauer *et al.*, 2006). Det allmänt vedertagna klassificeringssystemet idag är **BIPED** (**B**urden of disease marker, **I**nvestigative marker, **P**rognostic marker, **E**fficacy of intervention marker & **D**iagnostic marker). Beroende på vad en markör mäter hamnar den alltså i en specifik kategori. B är alltså markörer som indikerar hur stor skadan är vid OA. Markören ska stå direkt i relation till kliniska eller strukturella förändringar och skador. I anger att markörerna är under utredning i forskningsprojekt och anses vara intressanta för framtiden. Exempel på dessa är bland annat NGF, SP och IL-6. P är markörer som kan förutspå utvecklingen hos individer med tidig OA eller prognosen för redan manifesterad OA. E är markörer som kan användas för att mäta en behandlings effekt. D är markörer som används för att utesluta eller bekräfta sjukdom. En markör kan tillhöra flera kategorier samtidigt.

Idag används främst slätröntgen vid diagnostik av OA (Bauer *et al.*, 2006). De radiologiska markörer som finns för OA är inte särskilt sensitiva, detta då de tidiga tecknen på OA inte kan monitoreras via röntgen. Strukturell vävnadsdestruktion måste finnas innan röntgen indikerar OA (Bay-Jensen *et al.*, 201). Radiologiska markörer är därför av ringa värde vid tidig OA. Forskningens intresse gällande tidig diagnos av OA har istället riktats mot mätbara markörer i ledvätska, blod och urin (Lafeber & Van Spil, 2013). En av de största nackdelarna med fungerande markörer för OA i urin och blod är detta visar en systemisk påverkan och inte lokaliserar den aktuella OA-leden som är håltutlösande. En biomarkör som inte påvisas vid en normal metabolism av vävnaderna utan endast finns i den patologiska leden och inte i den friska vore av störst värde (McIlwraith, 2010).

## MATERIAL OCH METODER

### Material

Hästar som inkom till universitetsdjursjukhuset (UDS) hästklinik för utredning av hälta med misstänkt ursprung från led ingick i studien och där en objektiv hältundersökning med dataprogrammet Qualisys inkluderades. Insamlingen pågick under hösten 2016. Insamlingen inkluderade flera olika leder, där misstanke om OA förändringar förelåg. Djurägarna fick fylla i ett frågeformulär gällande hästarnas användning, träningsnivå, tidigare skador samt hur länge hältan pågått.

Ledvätska aspirerades från leden i samband med ledanestesi och under utredningstillfället togs även ett blodprov. För insamlande av material fanns godkänd etisk ansökan, Uppsala Djuretiska Nämnd diarienummer 2013-05-30 C62/13. Information om studien gavs till djurägarna som godkände deltagande genom ett undertecknat djurägarmedgivande.

### Metod

Med dataprogrammet Qualisys, som objektiv mätmetod, konstaterades tillsammans med veterinär att deltagande hästar ha en så stor rörelseasymmetri att det ansågs vara en klinisk hälta. Veterinären graderade hältorna subjektivt med en femgradig skala där 0 är ohalt och 5 är ej viktbarande, "blockhalt". Graderingen är den som lärs ut på veterinärprogrammet vid SLU, Uppsala och den som används av veterinärerna vid UDS hästklinik, Uppsala. Se tabell två för utförligare information om graderingsskalan som används för hältor vid UDS hästklinik, Uppsala.

Tabell 1 *Subjektiv hältgradering av veterinär, UDS Uppsala.*

0 grader	Ohalt
0,5 grader	Lindrig, ihållande markering i trav
1 grad	Tydlig hälta i trav
1.5 grader	Tydlig – måttlig hälta i trav
2 grader	Måttlig hälta
3 grader	Måttlig till kraftig hälta i trav, syns intermittent i skritt
4 grader	Kraftig hälta i trav, tydlig i skritt

Qualisys är ett kamerabaserat system som mäter den vertikala rörelsen hos hästen på bestämda punkter för att hitta asymmetrier i deras rörelser. Detta görs genom att höghastighetskameror filmar hästen när den först en gång skrittar och därefter travar på hårt rakt spår, samt på mjukt underlag på böjt spår i båda varven och slutligen på hårt rakt spår efter böjprov, allt detta både före och efter diagnostisk anestesi för att lokalisera hältan. Hästen får tre reflexmarkörer i pannan, tre reflexmarkörer över manken och tre markörer på korset som reflekterar ljus från kamerorna. Därigenom mäts markörernas position och en objektiv mätning av hästens rörelsemönster erhålls. Ur detta beräknas för både höger och vänster sida varje markörgrupps max- och minimihöjd. Programmet ritar upp en sinuskurva med hjälp av dessa data och veterinären kan sedan använda denna kurva i diagnosticeringen av vilket ben som är det halta. Samtidigt som denna objektiva mätning sker gör en erfaren veterinär med vana från ortopediska fall en subjektiv bedömning av alla i studien ingående hästar. I förväg hade det bestämts att om veterinär och program skulle vara oense så väger veterinärens åsikt tyngst.

Efter provinsamlingen centrifugerades alla prover vid 450 x g i 10 minuter vid 4°C. Supernatanten från både ledvätska och serum fördes över till mindre eppendorfrör som märktes upp och förvarades i -80°C. Nivåerna av NGF, SP och IL-6 mättes i serum och ledvätska med hjälp av ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Tabell 1). ELISA-protokollet utgjorde en sandwich ELISA, och tre ELISA-analyser utfördes, en för respektive markör. Dessa är alla uppbyggda av antikroppar riktade mot de ekvina proteinerna och därmed hästspecifika. Alla tester genomfördes enligt tillverkarnas instruktioner. I alla fall utom för häst 3 vänster bak glidled och häst 9 vänster bak glidled utfördes proverna i duplikat enligt tillverkarnas rekommendation och ett medelvärde för duplikaten användes i beräkningar av resultaten. Protokollen för respektive ELISA finns bifogat som bilagor 1.1, 1.2 och 1.3.

Tabell 2 *Produktinformation ELISA-kit*

<b>Horse Interleukin-6 ELISA kit</b>	MyBioSource	katalognummer MBS706136
<b>Horse Substance P (SP) ELISA kit</b>	MyBioSource	katalognummer MBS018167
<b>Horse Nerve Growth Factor ELISA kit</b>	MyBioSource	katalognummer MBS040618

En standardkurva konstruerades utifrån kända koncentrationer med hjälp av "four parametric logistic curve fit" ([www.myassays.com](http://www.myassays.com)). Provernans koncentration beräknades därefter utifrån

standardkurvan. Prover som låg under standardkurvans lägsta värde (13,5 ng/ml för NGF, 16,3 pg/ml för SP, 3,2 pg/ml för IL-6) ansågs ej detekterbara.

Totalprotein (Advia 2120, Siemens Healthcare Diagnostics, Erlangen, Tyskland) och totalantalleukocyter (Architect c4000, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) analyserades av laboratorium för klinisk kemi vid UDS Uppsala.

Kategorisering av prover gjordes avseende om hältan släcktes med ledanestesi (hältutlösande led) eller inte (icke hältutlösande led). Dessutom delades hästarna upp efter anamnestiska uppgifter avseende hältduration i akuta hältor (< 4 veckor) samt kroniska hältor (> 4 veckor).

## RESULTAT

Hästarna som deltog i studien var 6-19 år gamla och av olika raser inom olika användningsområden. Deras problem varierade från att ha pågått i 10 dagar till 4 månader. De användes inom olika områden på varierande nivå. I tabell två är alla fall presenterade med bakgrundsfakta. Alla fall har fått en siffra tilldelad i den ordning de kom till kliniken. Hältgraden presenteras i relation till där den var som tydligast om ej någon initialhälta syntes.

Tabell 3 Hästinformation

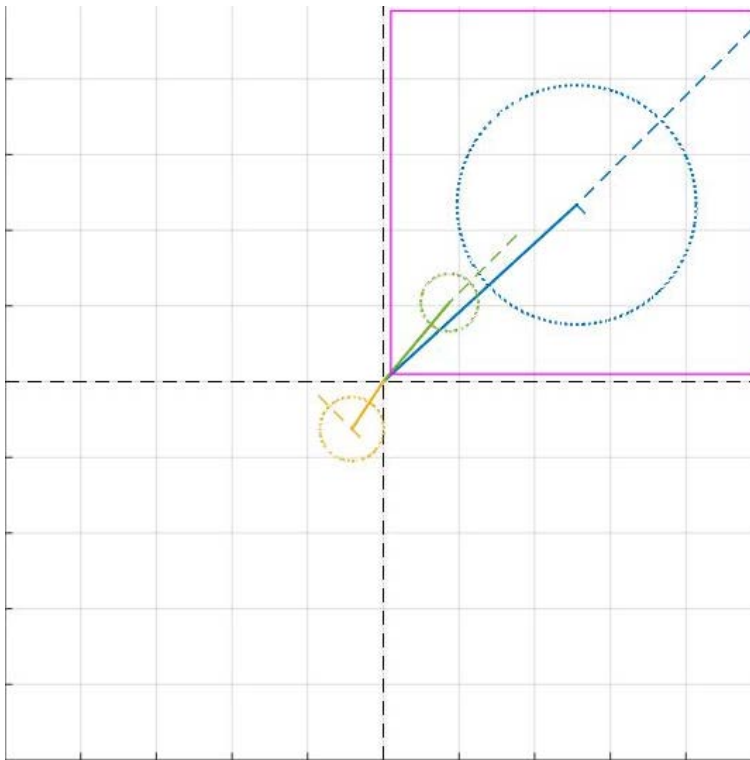
#	Ras	Kön	Ålder	Hält grad	Hält-duratio n i veckor	Resultat led- anestesi	Provernas ursprung	Total- protein (<20 g/L)	Leuko- cyter 10x6/L
1	Sv halvblod	Val	7	1° vv HF	4-5	Negativ	HF kotled	10,3	-
2	Dk halvblod	Sto	12	1,5° vv VF+ VB	2-4	Positiv Negativ	VF kotled VB tc-led	12,6 16,5	100 80
3	Sv halvblod	Sto	9	<1° BP VB	2-4	Positiv Positiv	VB tc-led VB glidled	10,5 <8	- -
4	Holsteiner	Val	10	0,5° HB	2-4	Negativ	HB höftled	14,9	160
5	Holländskt halvblod	Sto	6	0,5° HF	1,5	Positiv	HF kotled	10,6	180
6	Islandshäst	Sto	17	1,5° HF hö BP	16	Delvis positiv	HF carpus rc HF carpus ic	10,5 <8	- -
7	PRE	Sto	10	0,5- 1° VF	8-9	Negativ	VF carpus ic	21,6	130
8	Sv halvblod	Val	14	1° VF	10	Negativ	VF kotled	9,0	170
9	Korsning	Val	19	1,5° VB	4-5	Negativ Positiv	VB tc-led VB glidled	8,4 -	90 -
10	Welsh Ponny	Val	9	2° BF lå BP	3	Delvis positiv	HF hovled HF kotled	<8 <8	80 90

11	Connemara	Val	19	0,5° HB	4-5	Delvis positiv	HB kotled	15,2	620
12	Sv halvblod	Sto	8	1° VF hö BP	2-4	Positiv Positiv	VF carpus rc VF carpus ic	9,6 9,6	- 150
13	Islandshä t	Sto	8	0,5° VF	*	Negativ Negativ Negativ	VF kota VF carpus rc VF carpus ic	10,8 15,8 - -	170 50 90
14	Import	Val	7	1,5° HF	3	Negativ Negativ	HF carpus rc HF carpus ic	20,9 17,8	270 80

*Sv = svenskt, Dk = danskt, TC = tarsocruralled, glid = glidled, RC = radiocarpalled, IC = intercarpalled, Vv = volt i vänster varv, BP = böjprov. Val = valack. I de fall inget annat anges refererar hältgraden till den häla som syntes på rakt spår. \* Djurägarna till häst 13 uppskattade ej hur länge hältan pågått och därför saknas den informationen. Positiv ledanestesi innebär att hältan släcktes, delvis att den minskades och negativ att hältan kvarstod efter ledbedövning.*

I samtliga redovisade fall förelåg samstämmighet mellan den undersökande veterinären och Qualisys gällande vilket ben som hältan utgick från. I samtliga fall där veterinären ansåg ledanestesi vara positiv visade Qualisys en minskning i rörelseasymmetri.

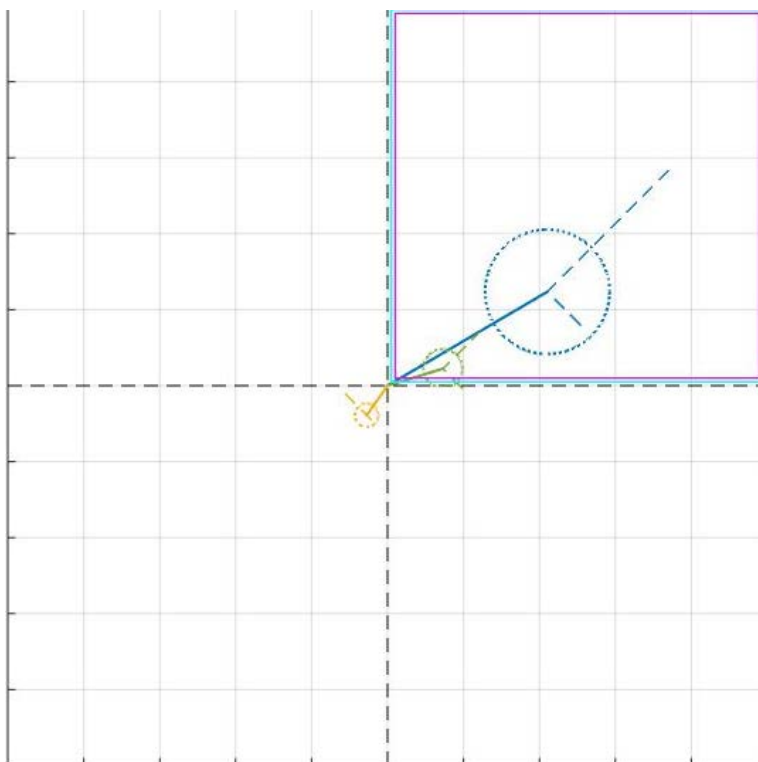
I figur 2 går det att utläsa att en rörelseasymmetri föreligger. Där huvudets (blå linje) och mankens vertikala asymmetri (grön linje) indikerar att hästen är halt på höger fram. Ett resultat även veterinären kommit fram till innan detta diagram avlästes. Asymmetrin för sakrums rörelse (gul linje) kan vara en kompensatorisk asymmetri eller en del av hästens naturliga rörelsemönster och bedöms ej ha någon relevans. Veterinären yttrade sig inte gällande någon bakbenshälta.



Figur 2. Bild från Qualisys mätning vid lågt böjprov häst nr 5. Den lila rutan markerar vilket ben böjprovet utförts på. Den blå linjen är rörelseasymmetrier för huvudet. Den gröna visar mankens rörelseasymmetri och den gula visar på sakrums asymmetri. Ringarna visar hur stor avvikelse det var i asymmetri mellan olika steg. På denna bild visas en rörelseasymmetri på höger framben efter böjprov som veterinären subjektivt bedömde som en hälta.

I figur 3 indikerar programmet att asymmetrin har minskat vid avläsningen av ledanestesin. Veterinären ansåg också att hälтан helt hade släckts. Kvarvarande asymmetri är svår att avgöra om den är smärtinducerad (smärta) eller tillhör hästens naturliga rörelsemönster.



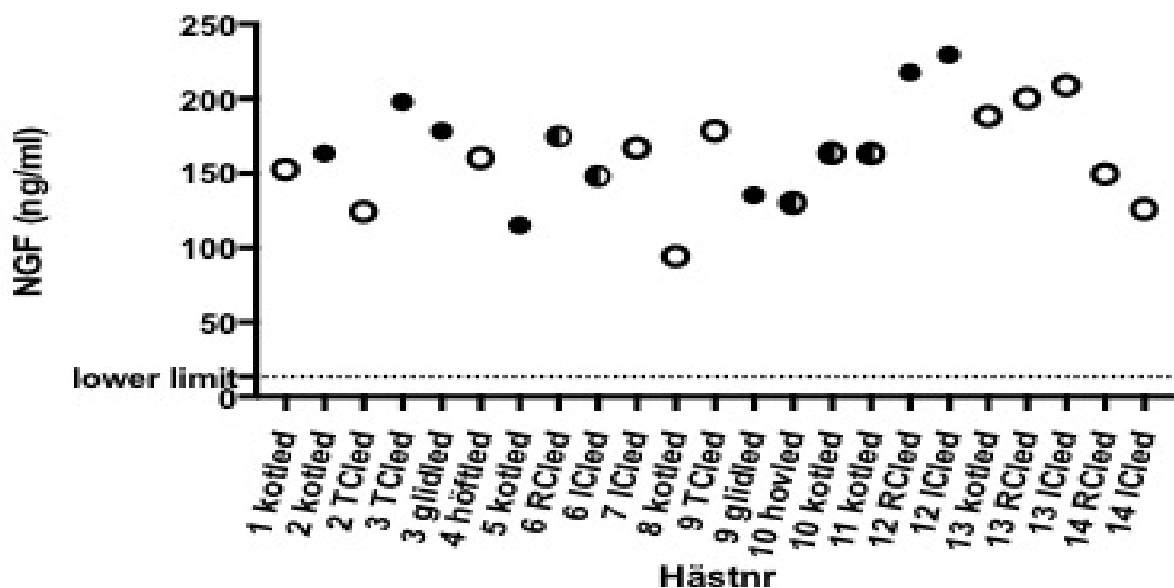


Figur 3. Bild från Qualisys mätning vid lågt böjprov häst nr 5, efter bedövning av kotled. Den lila rutan indikerar vilket ben böjprov utfördes på. Den gula linjen är sakrums asymmetri, den gröna är mankens rörelseasymmetri och den blå är huvudets rörelseasymmetrier. De runda ringarna är avvikelser i asymmetrin mellan olika steg. Veterinären bedömde hästen subjektivt till att vara ohalt och de asymmetrier som syns på bilden kan vara en del av hästens naturliga rörelsemönster.

Koncentrationerna av IL-6, NGF och SP i ledvätska och serum från samtliga hästar redovisas i figur 4 – 10. Resultaten visar tydligt att koncentrationerna avseende NGF, SP och IL-6 kan mätas i serum och ledvätska med kommersiell ELISA.

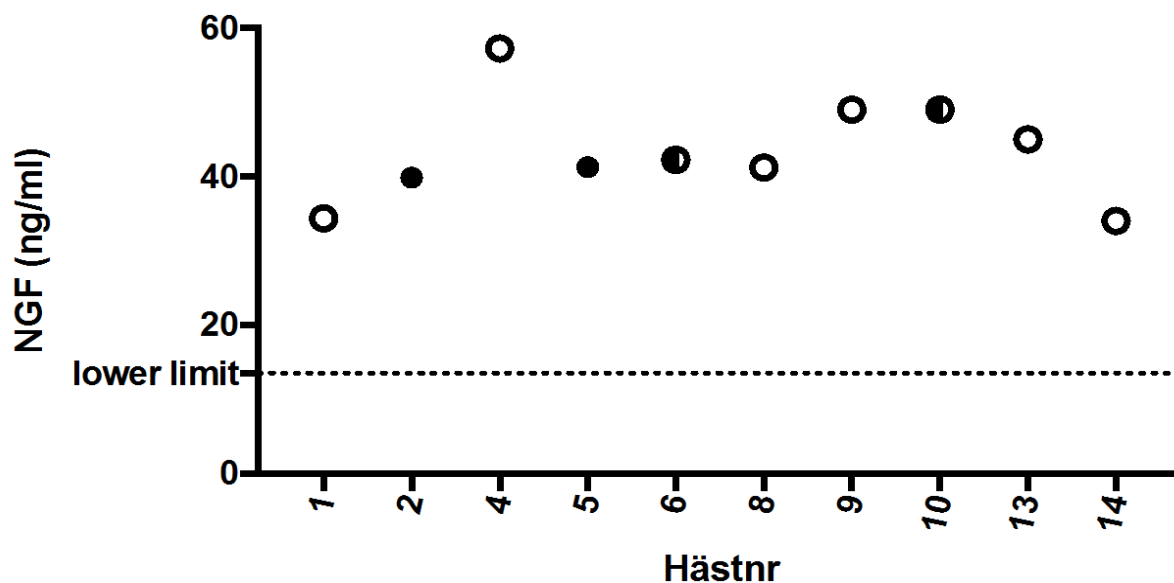
I vissa fall tillät inte djurägaren att ett blodprov inkluderades i undersökningen, varför dessa serumvärden saknas. När mindre än 1 ml ledvätska aspirerades från en led kunde prov för analys av leukocyter inte inkluderas. I två av proverna var mängden ledvätska för liten för att genomföra en ELISA avseende IL-6 (se bilaga 1.3).

I figur 4 illustreras mätvärden för NGF i all erhållen ledvätska. Alla låg över det lägsta mätbara värdet. Det gick inte att utläsa några tendenser eller resultat som indikerar skillnader mellan de hästar där hältan släcktes helt eller delvis jämfört med de hästar som fortsatte vara halta efter en ledanestesi.



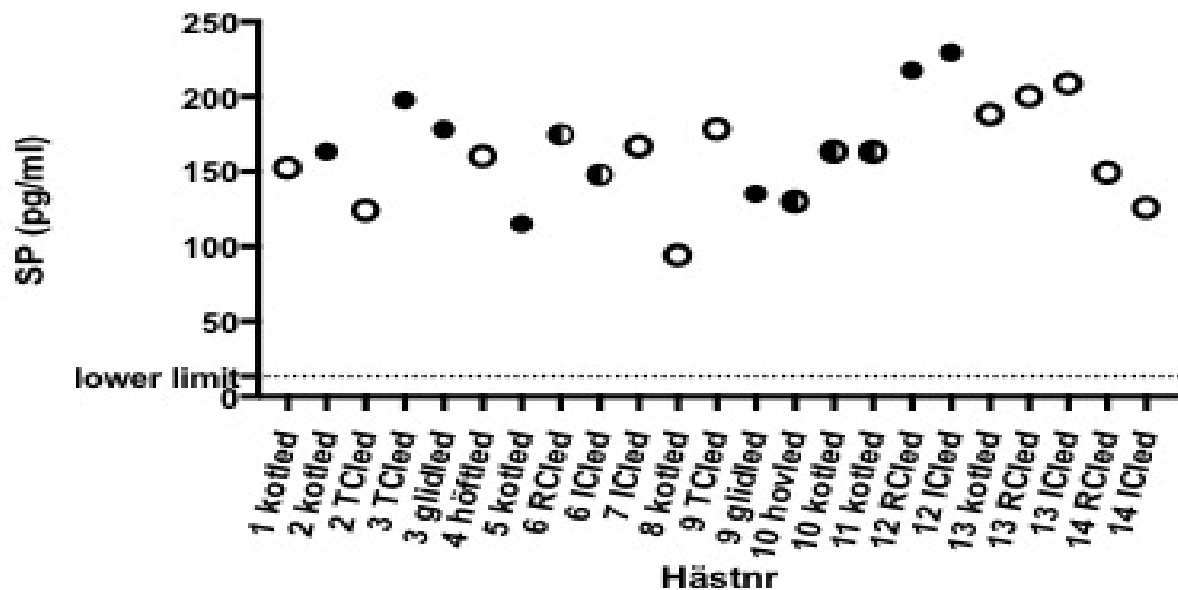
Figur 4 Koncentration av NGF i ledvätska. Tom cirkel är ej släckta hältor, halvfyllda cirklar är delvis släckta hältor och helfyllda är helt släckta hältor. TCled = tarsocruralled, RCled = radiocarpalled, ICled = intercarpalled. Lower limit är minsta värdet som är mätbart på ett sätt tillförlitligt för analysen (13,5 ng/ml).

I figur fem visas nivåerna av NGF i serum hos de hästar där blodprover erhöles. Det gick inte att se några skillnader i koncentrationer mellan hästar med konstaterade hältutlösande leder jämfört med icke hältutlösande.



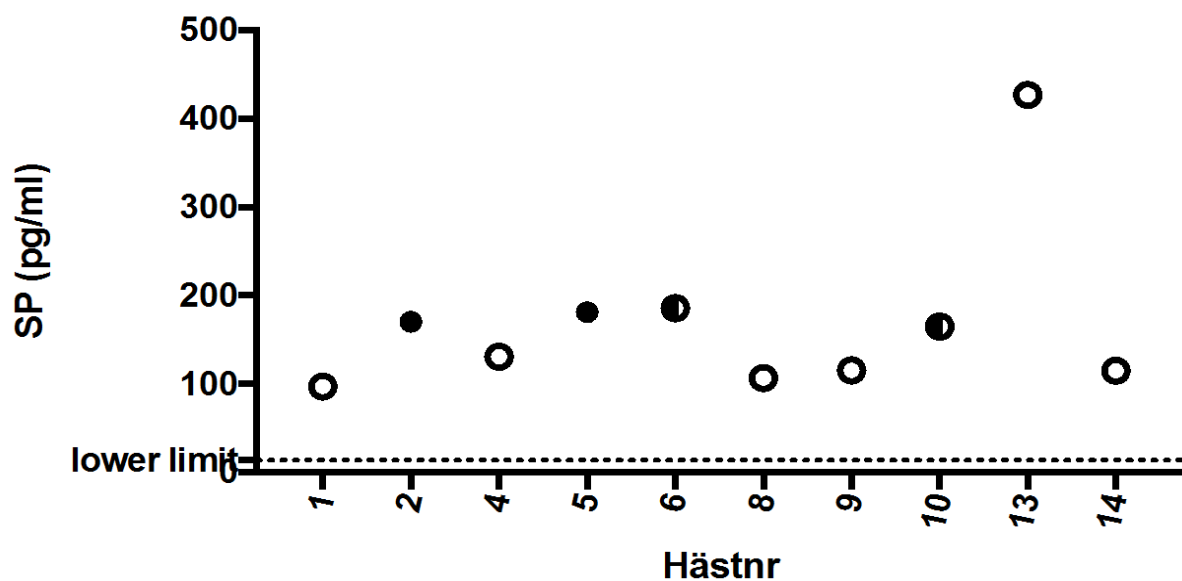
Figur 5 Koncentration av NGF i serum. Tom cirkel är ej släckta hältor, halvfyllda cirklar är delvis släckta hältor och helfyllda är helt släckta hältor. Lower limit är minsta värdet som är mätbart på ett sätt tillförlitligt för analysen (13,5 ng/ml).

I figur 6 illustreras mängden SP i ledvätskan. Det gick inte att utläsa några tendenser till förändrade nivåer i hältutlösande jämfört med icke hältutlösande leder.



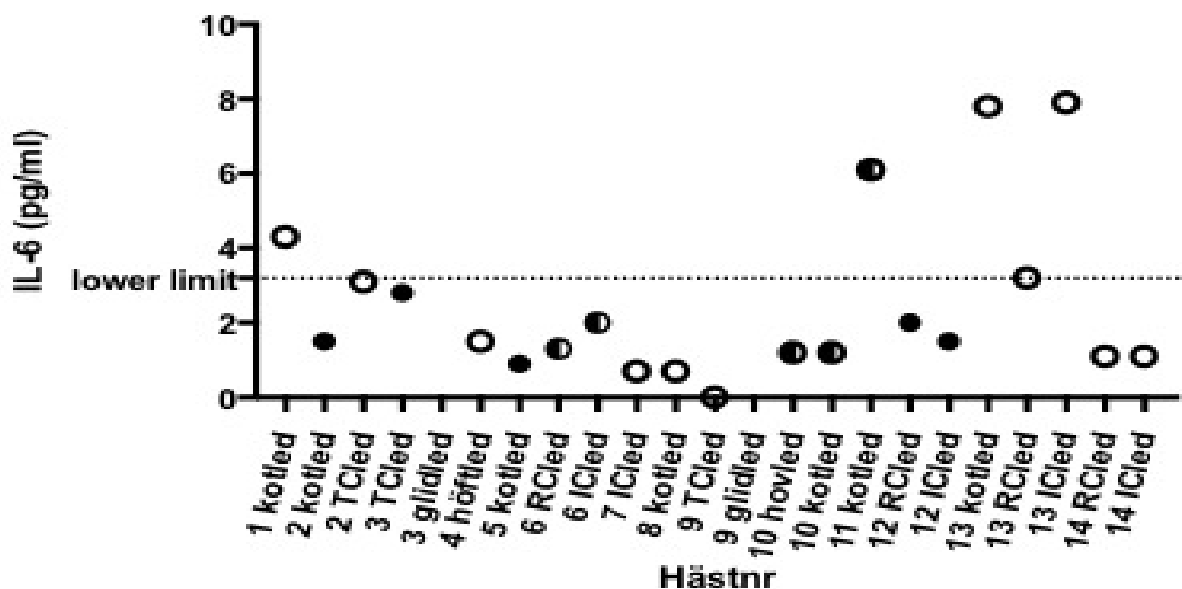
Figur 6 Koncentration av SP i ledvätska. TCled = tarsocruralled, RCled = radiocarpalled, ICled = intercarpalled. Tom cirkel är ej släckta hältor, halvfyllda cirklar är delvis släckta hältor och helfyllda är helt släckta hältor. Lower limit är minsta värdet som är mätbart på ett sätt tillförlitligt för analysen (16,3 pg/ml).

I figur sju redovisas nivåerna av SP i serum hos de hästar där blodprover erhöles. Häst nr 13 hade ett mycket högre värde än alla övriga provtagna leder. I övrigt går det inte att utläsa några skillnader mellan olika grupper.



Figur 7 Koncentration av SP i serum. Tom cirkel är ej släckta hältor, halvfyllda cirklar är delvis släckta hältor och helfyllda är helt släckta hältor. Lower limit är minsta värdet som är mätbart på ett sätt tillförlitligt för analysen (16,3 pg/ml).

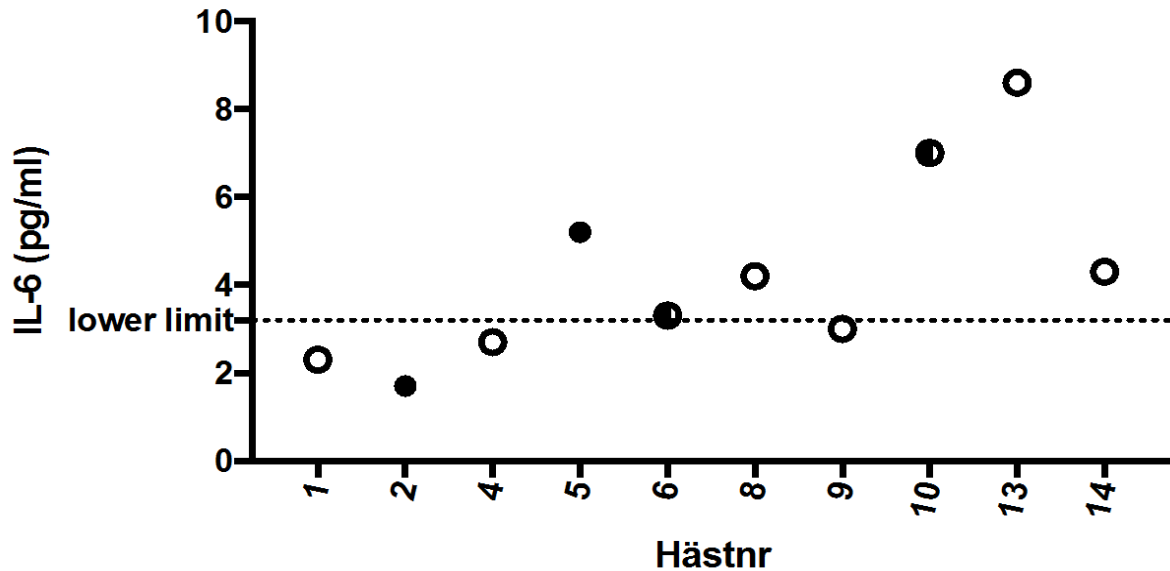
I figur åtta redovisas analysresultaten för IL-6 i ledvätska. En stor del av proverna låg nivåerna under lower limit och dessa låga värden anses inte detekterbara med denna ELISA. Inget av proverna från leder vars hältor släcktes helt av ledanestesi hade mätbara koncentrationer av IL-6.



Figur 8 Koncentration av IL-6 i ledvätska. Tom cirkel är ej släckta hältor, halvfyllda cirklar är delvis släckta hältor och helfyllda är helt släckta hältor. Lower limit är minsta värdet som är

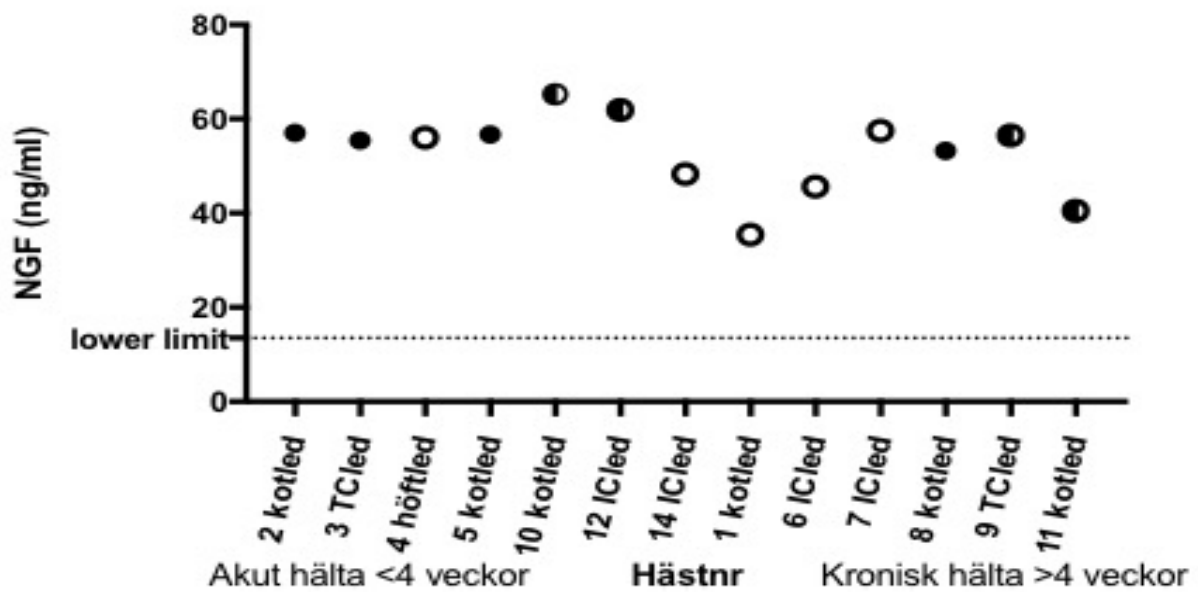
mätbart på ett sätt tillförlitligt för analysen (3,2 pg/ml). RCled = radiocarpalled, TCled = tarsocruralled, ICled = intercarpalled.

I figur nio redovisas analysresultaten för IL-6 i serumproverna. Hälften av proverna låg under eller precis över lower limit värdet.



Figur 9 Koncentration av IL-6 i serum. Tom cirkel är ej släckta häftar, halvfyllda cirklar är delvis släckta häftar och helfyllda är helt släckta häftar. Lower limit är minsta värdet som är mätbart på ett sätt tillförlitligt för analysen (3,2 pg/ml).

I figur 10 redovisas skillnader i koncentration av NGF i ledvätska mellan hästar med akut och kronisk häfta. En tendens till högre koncentrationer i ledvätska från hästar med akut häfta kan ses. Inga liknande tendenser gick att se för SP eller IL-6.



Figur 10 Koncentration av NGF i ledvätska från akuta (Häst nr 2, 3, 4, 5, 10, 12 och 14) och kroniska hältor (Häst nr 1, 6, 7, 8, 9 och 11). Tom cirkel är ej släckta hältor, halvfyllda cirklar är delvis släckta hältor och helfyllda är helt släckta hältor. Lower limit är minsta värdet som är mätbart på ett sätt tillförlitligt för analysen (13,5 ng/ml). TCled = tarsocruralled, ICled = intercarpalled.

## DISKUSSION

Syftet med studien var att undersöka om kommersiella ELISA för hästens NGF, SP eller IL-6 kan användas för att mäta dessa biomarkörer i ledvätska och serum. Vi ville dessutom undersöka om de har potential att fungera som biomarkör för inflammation och/eller smärta i ledvätska och/eller serum hos halta hästar. Alla genomförda ELISA analyser av IL-6, NGF och SP i både ledvätska och serum uppvisade dektekterbara nivåer av respektive biomarkör.

Sjukdomar från rörelseapparaten och då främst hälta är den vanligaste sjukdomen hos svenska hästar (Penell *et al.*, 2005). OA är den vanligaste orsaken till hälta enligt Agrias skadestatistik 1997-2000. Ledskadan har oftast pågått en tid innan strukturella vävnadsskador som kan påvisas vid en radiologisk undersökning uppstått. Därför behövs nya markörer för att diagnostisera en tidig OA med reversibla vävnadsskador i leden (Dieppe & Lohmander, 2005). Olika biomarkörer har länge undersökts som potentiella verktyg att diagnostisera en tidig skada i leden, men än finns inga biomarkörer som kan användas på individnivå.

I denna studie ingick en blandad grupp av hästar, i olika åldrar, användningsområden, ras, och duration av hälta. Ledvätskor är även analyserade från de leder där hältan inte lokaliserades med anestesi, något som skulle kunna tala för en frisk led. Dessa fall med negativ ledanestesiavläsning har använts som intern kontroll, men utgör ingen korrekt kontrollgrupp eftersom hästen är halt från annan led eller struktur. Tyvärr har ingen frisk kontrollgrupp funnits tillgänglig.

Koncentrationerna av NGF, SP och IL-6 visade inga tydliga samband med duration av hälta, eller med hältutlösande led. Det gick inte att se några tendenser till att de tre biomarkörerna stod i relation till varandra eller någon relation mellan serum och ledvätska. Eftersom materialet är litet och heterogent har ingen statistisk analys inkluderats i undersökningen. Tyvärr är antalet hästar för få och heterogent vad gäller hältduration, hältutlösande led, ålder och användningsområde för att några slutsatser avseende de tre biomarkörernas potential som smärt och inflammations markörer ska kunna göras.

I denna studie skiljde sig resultatet för IL-6 från tidigare gjorda studier (Bertone, 2001). Bertone och medarbetare visade att IL-6 var en utmärkt indikator för ledpatologier, med mätbara nivåer endast i leder med akuta och kroniska patologiska tillstånd, utan mätbara nivåer i friska kontrollleder. Skillanden i resultat skulle kunna bero på att olika analysmetoder använts. Bertrone och medarbetare använde en immunoassay utprovad för humant IL-6 medan denna studie använde en avsedd för hästar. Bertrones studie inkluderade också fler hästar (89 st) med en okänd uppdelning av akut och kronisk duration av hälta samt gradering av ledskada vid radiologisk undersökning.

Koncentrationerna för SP skiljer sig från tidigare studier gjorda på häst med OA, (Caron 1992; Kirker-Head, 2000). och nivåerna av SP var signifikant förhöjda i OA-leder jämfört med friska leder (Caron, 1992). I denna pilotstudie uppmättes en högre medelkoncentration för SP, vilket det

finns flera tänkbara orsaker till. Carons studie (1992) inkluderade ett annat material av hästar vilka avlivats av annan orsak än hälta och analysmetoderna var annorlunda.

Halliday *et al.*, 1998 kvantifierade NGF-nivåer i human ledvätska där de uppmätte signifikant högre koncentrationer av NGF i de patologiska lederna (medelkoncentration 430 – 523 pg/ml) jämfört med de friska kontrollerna (medelkoncentration 95 pg/ml). Till skillnad från Hallidays studie erhöles i denna studie ett högre medelvärde för NGF i ledvätska (52,22 ng/ml). Detta kan förklaras av skillnader i analysmetoden samt olika djurslag.

I en annan studie utförd på hundar undersökte Isola med flera (2011) koncentrationer av NGF hos en frisk kontrollgrupp, akut halta hundar utan radiologiska tecken på kronisk OA och kroniska OA-hundar med en hålteduration över en månad med radiologiska tecken på sjukdom. ELISA-analysen utgjordes av anti ovintNGF och medelkoncentrationen var 3,65 pg/ml för de friska hundarna, 6,45 pg/ml för de akut insjuknade hundarna och för de kroniska OA-hundarna 20,19 pg/ml. Den lägre koncentrationen i Isolas studie jämfört med den presenterade häststudien kan bero på species skillnader och att ELISAn inte var hundspecifik, dessutom var materialet klassificerat olika. De akut halta hästarna uppvisade marginellt högre nivåer än de med en hålteduration > 4 veckor, vilket skiljer sig från Isolas studie där hundar med kronisk radiologisk OA uppvisade de högsta nivåerna. Det som är intressant för denna studie är att oavsett håltans ursprung, ledorsakad eller icke ledutlöst, så har alla led- och serumprover mätbara nivåer av NGF.

Det kommer att behövas fler studier för att avgöra om NGF, SP och IL-6 kan ha potential som framtida biomarkörer för tidig diagnostik av OA. En orsak till brist på entydigt resultat i denna studie skulle kunna vara att subkondrala bensador och periartikulära mjukdelsskador som uppstår vid långvarig hälta till följd av en kronisk OA inte helt bedövas bort vid en ledanestesi. Det skulle också kunna vara så att en samtidig smärta i annan vävnad på samma ben fortfarande gör att håltan kvarstår. Detta skulle kunna förklara varför dessa smärt- och inflammationsmarkörer inte är tydligt förhöjda i delar av populationen, med misstänkta kroniska skador.

Fall nr 13 hade högst uppmätta koncentrationer av SP i serum, näst högst uppmätta värden av SP i två av lederna (RC-led + IC-led) samt höga värden i kotleden som bedövades, högst uppmätta koncentrationer av IL-6 i två av tre leder (kotled + IC-led) samt i serum. Utöver detta hade fall 13 höga koncentrationer av NGF i serum. Vid håltutredningen hittades dock ingen håltutlösande led, trots tre ledbedövningar. En möjlig förklaring till att ledanestesiavläsningarna var negativa trots höga koncentrationer av NGF och SP i ledvätska kan vara att NGF uppreglerar både perifer och central sensitisering (Arendt-Nielsen *et al.*, 2010). De höga nivåerna av NGF skulle därmed kunna påverka sensitiseringen längs med de centrala nerverna och eventuella periartikulära mjukdelsskador skulle kunna uppfattas som mer smärtande än liknande mjukdelsskador hos individer med friska leder.



Ett av de största problemen med studier utformade som denna, är att erhålla provmaterial från hästar som fyller alla kriterier för studien. Detta beror till stor del på om veterinären väljer att göra en ledanestesi eller en annan sorts diagnostisk anestesi. Då det alltid finns en risk med att göra en ledpunktion så bör tillräcklig indikation för den sortens diagnostik finnas. Många gånger valde utredande veterinär att lägga en nervblockad istället för att exempelvis lägga en hovledsanestesi. Detta troligen för att indikationer såsom svullnad eller böjprovsreaktioner inte kändes som tillräckligt betydande för att punktuera en led. Det är fler hästar som behandlas och utreds för hälta varje vecka vid hästkliniken på UDS Uppsala, än de som deltog i studien. Fler hästar hade kunnat ingå i studien om det även varit möjligt att inkludera redan inskrivna hästar. Anledningen till att det inte gick var att kriterierna för studien såsom objektiv hältbedömning, ledanestesi och positiv avläsning inte uppfylldes.. Det hade även blivit svårt att få djurägares skriftliga tillstånd för deltagande i studien i efterhand. Fyra av de hästar som inkluderas i studien saknar serumprover då djurägarna ej tillät att blodprov lämnades. Qualisys skulle dessutom behöva utvärderas i större utsträckning och faktiska gränsvärden för vad som är en asymmetri och vad som är en hälta behövs. En skala för hältans grad som är gjord utifrån programmet Qualisys istället för de gängse gradskalor som finns för hälta nu behövs också.

Det är fortfarande i högsta grad möjligt att alla tre substanser är fungerande biomarkörer för tidig OA. För att på ett så tillförlitligt sätt som möjligt kunna uttala sig om huruvida de fungerar som markörer för diagnostik av tidig OA bör framtida studier inkludera prover från hästar där hältaduration och ledpatologi är väl definierade. Kontrollerna måste vara helt friska, utan historia av hälta och ledsjukdom. Experimentella studier med mer material som är matchat i ålder och har friska kontroller kan vara alternativ. Det etiska i att genomföra studier med experimentellt framkallad OA bör diskuteras, men sådana studier kan vara av värde då OA idag är en av de vanligaste orsakerna till utslagning av sporthästar. Behovet av fungerande markörer för tidig diagnostik är stort.

## REFERENSLISTA

- Amin, S., LaValley, M. P., Guermazi, A., Grigoryan, M., Hunter, D. J., Clancy, M., Niu, J., Gale, D. R. & Felson, D. T. (2005). The relationship between cartilage loss on magnetic resonance imaging and radiographic progression in men and women with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 52(10), pp 3152–3159.
- Arendt-Nielsen, L., Nie, H., Laursen, M. B., Laursen, B. S., Madeleine, P., Simonsen, O. H. & Graven-Nielsen, T. (2010). Sensitization in patients with painful knee osteoarthritis. *PAIN*, 149(3), pp 573–581.
- Bajaj, P., Bajaj, P., Graven-Nielsen, T. & Arendt-Nielsen, L. (2001). Osteoarthritis and its association with muscle hyperalgesia: an experimental controlled study: *Pain*, 93(2), pp 107–114.
- Bassage, L. H. & Ross, M. W. (2011). Diagnostic Analgesia. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. pp 100–135. Elsevier. ISBN 978-1-4160-6069-7.
- Bauer, D. C., Hunter, D. J., Abramson, S. B., Attur, M., Corr, M., Felson, D., Heinegård, D., Jordan, J. M., Kepler, T. B., Lane, N. E., Saxne, T., Tyree, B. & Kraus, V. B. (2006). Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis and Cartilage*, 14(8), pp 723–727.
- Bay-Jensen, A. C., Reker, D., Kjølgaard-Petersen, C. F., Mobasher, A., Karsdal, M. A., Ladel, C., Henrotin, Y. & Thudium, C. S. (2016). Osteoarthritis year in review 2015: soluble biomarkers and the BIPED criteria. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(1), pp 9–20.
- Bertone, A. L., Palmer, J. L. & Jones, J. (2001). Synovial Fluid Cytokines and Eicosanoids as Markers of Joint Disease in Horses. *Veterinary Surgery*, 30(6), pp 528–538.
- Buchner, H. H. F., Savelberg, H. H. C. M., Schamhardt, H. C. & Barneveld, A. (1996). Head and trunk movement adaptations in horses with experimentally induced fore- or hindlimb lameness. *Equine Veterinary Journal*, 28(1), pp 71–76.
- Caron, J. P. (2011). Chapter 61 - Osteoarthritis A2 - Ross, Mike W. In: Dyson, S. J. (Ed) *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse (Second Edition)*. pp 655–668. Saint Louis: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4160-6069-7.
- Caron, J. P., Bowker, R. M., Abhold, R. H., Toppin, D. S., Sonea, I. M. & Vex, K. B. (1992). Substance P in the synovial membrane and fluid of the equine middle carpal joint. *Equine Veterinary Journal*, 24(5), pp 364–366.
- Dieppe, P. A. & Lohmander, L. S. (2005). Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *The Lancet*, 365(9463), pp 965–973.
- Dyce, K. M., Sack, W. O. & Wensing, C. J. G. (2010). *Textbook of veterinary anatomy*. 4th ed. St. Louis, Mo: Saunders/Elsevier. ISBN 978-1-4160-6607-1.
- Dyson, S. (1997). An approach to hindlimb lameness 2. Gait assessment, flexion tests and what to do next. *In Practice*, 19(1), pp 14–20.
- Fiske-Jackson, A. (2015). Objective lameness assessment: can it really tell us anything different? *Livestock*, 20(3), pp 173–177.
- Frisbie, D. D., Ghivizzani, S. C., Robbins, P. D., Evans, C. H. & McIlwraith, C. W. (2002). Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Therapy*, 9(1), pp 12–20.

- Frisbie, D. D., McIlwraith, C. W. & de Grauw, J. C. (2016). 10 - Synovial Fluid and Serum Biomarkers. *Joint Disease in the Horse (Second Edition)*. pp 179–191. Edinburgh: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4557-5969-9.
- Glyn-Jones, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., Price, A. J., Vincent, T. L., Weinans, H. & Carr, A. J. (2015). Osteoarthritis. *The Lancet*, 386(9991), pp 376–387.
- Grauw, J. C., Lest, C. H. A., Weeren, R., Brommer, H. & Brama, P. A. J. (2006). Arthrogenic lameness of the fetlock: synovial fluid markers of inflammation and cartilage turnover in relation to clinical joint pain. *Equine Veterinary Journal*, 38(4), pp 305–311.
- Halliday, D., Zettler, A., Rush, C., Scicchitano, R., & McNeil, R. (1998). Elevated Nerve Growth Factor Levels in the Synovial Fluid of Patients with Inflammatory Joint Disease. *Neurochemical Research*, 23(6), pp 919–922.
- Hardy, J., Bertone, A. L., Weisbrode, S. E., Muir, W. W., O'Dorisio, T. M. & Mast, J. (1998). Cell trafficking, mediator release, and articular metabolism in acute inflammation of innervated or denervated isolated equine joints. *American Journal of Veterinary Research*, 59(1), pp 88–100.
- Hvid, I. (1988). Mechanical strength of trabecular bone at the knee. *Danish Medical Bulletin*, 35(4), pp 345–365.
- Isola, M., Ferrari, V., Miolo, A., Stabile, F., Bernardini, D., Carnier, P. & Busetto, R. (2011). Nerve growth factor concentrations in the synovial fluid from healthy dogs and dogs with secondary osteoarthritis: *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 24(4), pp 279–284.
- Jiang, Y., Hu, C., Yu, S., Yan, J., Peng, H., Ouyang, H. W. & Tuan, R. S. (2015). Cartilage stem/progenitor cells are activated in osteoarthritis via interleukin-1[beta]/nerve growth factor signaling.(Report). 17(328).
- Kawcak, C. E. (2016a). 2 - Biomechanics in Joints. *Joint Disease in the Horse (Second Edition)*. pp 25–32. Edinburgh: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4557-5969-9.
- Kawcak, C. E. (2016b). 4 - Pathologic Manifestations of Joint Disease. *Joint Disease in the Horse (Second Edition)*. pp 49–56. Edinburgh: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4557-5969-9.
- Kawcak, C. E., Barrett, M. F., Werpy, N. M. & Selberg, K. (2016). 9 - Principles of Diagnosis. *Joint Disease in the Horse (Second Edition)*. pp 119–178. Edinburgh: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4557-5969-9.
- Keegan, K. G., Yonezawa, Y., Pai, P. F., Wilson, D. A. & Kramer, J. (2004). Evaluation of a sensor-based system of motion analysis for detection and quantification of forelimb and hind limb lameness in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 65(5), pp 665–670.
- Keegan, K. G., Dent, E. V., Wilson, D. A., Janicek, J., Kramer, J., Lacarrubba, A., Walsh, D. M., Cassells, M. W., Esther, T. M., Schiltz, P., Frees, K. E., Wilhite, C. L., Clark, J. M., Pollitt, C. C., Shaw, R. & Norris, T. (2010). Repeatability of subjective evaluation of lameness in horses: Repeatability of subjective evaluation of lameness in horses. *Equine Veterinary Journal*, 42(2), pp 92–97.
- Keegan, K. G., Kramer, J., Yonezawa, Y., Maki, H., Pai, P. F., Dent, E. V., Kellerman, T. E., Wilson, D. A. & Reed, S. K. (2011). Assessment of repeatability of a wireless, inertial sensor-based lameness evaluation system for horses. *American Journal of Veterinary Research*, 72(9), pp 1156–1163.
- Kidd, J. A., Fuller, C. & Barr, A. R. S. (2001). Osteoarthritis in the horse. *Equine Veterinary Education*, 13(3), pp 160–168.
- Kirker-Head, C. A., Chandna, V. K., Agarwal, R. K., Morris, E. A., Tidwell, A., O'Callaghan, M. W., Rand, W. & Kumar, M. S. A. (2000). Concentrations of substance P and prostaglandin E2 in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. *American Journal of Veterinary Research*, 61(6), pp 714–718.

- Kojima, M., Ikeuchi, T. & Hatanaka, H. (1995). Role of nerve growth factor in the expression of *trkA* mRNA in cultured embryonic rat basal forebrain cholinergic neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 42(6), pp 775–783.
- Lafeber, F. P. J. G. & van Spil, W. E. (2013). Osteoarthritis year 2013 in review: biomarkers; reflecting before moving forward, one step at a time. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(10), pp 1452–1464.
- Lee, H., Kirkland, W. G., Whitmore, R. N., Theis, K. M., Young, H. E., Richardson, A. J., Jackson, R. L. & Hanson, R. R. (2014). Comparison of equine articular cartilage thickness in various joints. *Connective Tissue Research*, 55(5–6), pp 339–347.
- Ley, C., Ekman, S., Ronéus, B. & Eloranta, M.-L. (2009). Interleukin-6 and high mobility group box protein-1 in synovial membranes and osteochondral fragments in equine osteoarthritis. *Research in Veterinary Science*, 86(3), pp 490–497.
- Matayoshi, T., Goto, T., Fukuhara, E., Takano, H., Kobayashi, S. & Takahashi, T. (2005). Neuropeptide substance P stimulates the formation of osteoclasts via synovial fibroblastic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(3), pp 756–764.
- May, S. A. & Wyn-Jones, G. (1987). Identification of hindleg lameness. *Equine Veterinary Journal*, 19(3), pp 185–188.
- McCracken, M. J., Kramer, J., Keegan, K. G., Lopes, M., Wilson, D. A., Reed, S. K., LaCarrubba, A. & Rasch, M. (2012). Comparison of an inertial sensor system of lameness quantification with subjective lameness evaluation: Comparison of inertial system with subjective lameness evaluation. *Equine Veterinary Journal*, 44(6), pp 652–656.
- McIlwraith, C. W. (2010). Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Veterinary Journal*, 37(5), pp 473–482.
- McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D. & Kawcak, C. E. (2012). The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone & Joint Research*, 1(11), pp 297–309.
- Olive, J., D’Anjou, M.-A., Alexander, K., Laverty, S. & Theoret, C. (2010). Comparison of Magnetic Resonance Imaging, Computed Tomography, and Radiography for Assessment of Noncartilaginous Changes in Equine Metacarpophalangeal Osteoarthritis: MRI in Equine Metacarpophalangeal Osteoarthritis. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 51(3), pp 267–279.
- Penell, J. C., Egenvall, A., Bonnett, B. N., Olson, P. & Pringle, J. (2005). Specific causes of morbidity among Swedish horses insured for veterinary care between 1997 and 2000. *Veterinary Record*, 157(16), pp 470–477.
- Perrot, S. (2015). Osteoarthritis pain. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 29(1), pp 90–97 (Pain in systemic rheumatic diseases).
- Pfau, T., Fiske-Jackson, A. & Rhodin, M. (2016). Quantitative assessment of gait parameters in horses: Useful for aiding clinical decision making? *Equine Veterinary Education*, 28(4), pp 209–215.
- Raychaudhuri, S. P., Raychaudhuri, S. K., Atkuri, K. R., Herzenberg, L. A. & Herzenberg, L. A. (2011). Nerve growth factor: A key local regulator in the pathogenesis of inflammatory arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 63(11), pp 3243–3252.
- Rhodin, M., Pfau, T., Roepstorff, L. & Egenvall, A. (2013). Effect of lungeing on head and pelvic movement asymmetry in horses with induced lameness. *The Veterinary Journal*, 198, Supplement 1, pp e39–e45 (e-Supplement: 7th International Conference on Canine and Equine Locomotion Strömsholm, Sweden 25–28 June 2012).
- Séguin, C. A. & Bernier, S. M. (2003). TNF $\alpha$  suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 197(3), pp 356–369.

- Seidel, M. F., Wise, B. L. & Lane, N. E. (2013). Nerve growth factor: an update on the science and therapy. *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(9), pp 1223–1228 (Pain in Osteoarthritis).
- Starke, S. D., Willems, E., Head, M., May, S. A. & Pfau, T. (2012). Proximal hindlimb flexion in the horse: Effect on movement symmetry and implications for defining soundness: Proximal hindlimb flexion. *Equine Veterinary Journal*, 44(6), pp 657–663.
- Steel, C. M. (2008). Equine Synovial Fluid Analysis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 24(2), pp 437–454 (Clinical Pathology).
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R. & Mobasheri, A. (2009). The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, 179(1), pp 10–24.
- van Weeren, P. R. (2016). 1 - General Anatomy and Physiology of Joints. *Joint Disease in the Horse (Second Edition)*. pp 1–24. Edinburgh: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4557-5969-9.
- van Weeren, P. R. & Back, W. (2016). Musculoskeletal Disease in Aged Horses and Its Management. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(2), pp 229–247.
- Yui, N., Kobayashi, H., Terauchi, K., Yoshioka, H., Fujiya, H., Niki, H., Musha, H. & Yudoh, K. (2016). The role of atp-activated protein kinase(AMPK) in the chondrocyte energy balance and IL-1 $\beta$ -induced production of MMP-13 in osteoarthritis(OA). *Osteoarthritis and Cartilage*, 24, Supplement 1, pp S154–S155 (Abstracts from the 2016 OARSI World Congress on Osteoarthritis Promoting Clinical and Basic Research in Osteoarthritis).

## BILAGOR

### Bilaga 1.1

Bilaga av analysprotokollet för Nerve Growth Factor. Horse Nerve Growth Factor ELISA kit MyBioSource katalognummer MBS040618. Detta är ett utdrag ur det protokoll som användes för analyserna av NGF. Analyserna genomfördes på serum och ledvätska som angivits som möjliga medium i medföljande instruktioner.

#### Assay Procedures

**Please check all reagents and equipments before the experiments and make sure everything is right and OK!**

**Please do the experiments strictly to follow the assay procedures and DO NOT change any assay procedures arbitrarily!**

8.1) Bring all reagents and samples to room temperature (18°C-25°C) naturally for 30min before starting assay procedures. **DO NOT** use hot water baths to thaw samples or reagents. If necessary, doing a low - speed centrifugation for one or two seconds to concentrate the Standards to the bottom of the vials. The Microelisa Stripplate is detachable, detach unused strips from the plate frame, return them to the foil pouch with the desiccant pack, and reseal for preventing damp.

8.2) Set Standard wells, Sample wells and Blank/Control wells, add Standard 50µl to each Standard well, add Sample 50µl to each Sample well, add Sample Diluent 50µl to each Blank/Control well. It is recommended that all Standards, samples and Sample Diluent be added in duplicate to the plate.

8.3) Add 100µl of HRP-conjugate reagent to **each well**, cover with a Closure Plate Membrane and incubate for 60 minutes at 37°C.

8.4) Wash the plate 4 times.

8.4.1) **Manual Washing** – Dump the incubation mixtures of the wells into a sink or proper waste container. Using pipette or squirt bottle, fill each well completely with Wash Solution (1×), after about one minute's standing, invert and hit the plate onto absorbent papers or paper towels until no moisture appears. Repeat this procedure four times. **Note:** Hold the sides of the plate frame firmly when washing the plate to assure that all strips remain securely in frame.

8.4.2) **Automated Washing** - Aspirate all wells, then wash plates four times using Wash Buffer (1×). Always adjust your washer to aspirate as much liquid as possible and set fill volume at 350µl/well/wash. After final wash, invert plate, and blot dry by hitting plate onto absorbent paper or paper towels until no moisture appears.

8.5) Add Chromogen Solution A 50µl and Chromogen Solution 50µl to **each well** successively. Then **protect from light** to incubate for 15 minutes at 37°C.

8.6) Add 50µl Stop Solution to **each well**. The color in the wells should change from blue to yellow.

8.7) Read the Optical Density (O.D.) at 450 nm using an ELISA reader **within** 15 minutes after adding Stop Solution (Around 5 minutes is the best time.).

#### 8.8) Important Notes::

8.8.1) Protect all reagents from strong light during storage and incubation. All the bottle caps of reagents should be covered tightly to prevent the evaporation and contamination of microorganism.

8.8.2) Do not remove the plate from the foil pouch until needed. There may be some foggy substance in the wells when the plate is opened at the first time. It will not have any effect on the final assay results.

8.8.3) The concentration gradients of Standards of this kit have already covered far more than the range of concentration of this analyte in undiluted original samples, so please **DO NOT** use the diluted or non-original samples when using our kits, please assay the undiluted original samples directly, otherwise samples that prepared by chemical lysis buffer may cause unexpected results or contaminated, and moreover, the level of this analyte that has been diluted may out of the detection range of the kits.

8.8.4) The Sample Diluent are more than PBS, it also contains a little stabilizer and preservative. It is made well as a Blank/Control reagent (adjusted zero value) for the experiment, because the Standards also contain a little stabilizer and preservative, so **DO NOT** use your own PBS or other reagents as a Blank/Control reagent, even if you have used it to collect your samples.

8.8.5) Samples or Reagents Addition: Please carefully add samples to wells and mix gently to avoid foaming. **DO NOT** touch the well wall as possible. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents or samples to the assay plate should not exceed 10 minutes. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption. Duplication of all standards and samples, although not required, is recommended. To avoid contamination, please use fresh disposable pipette tips for each transfer.

8.8.6) Incubation: To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary. **DO NOT** allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents have been added to the well strips, **DO NOT** let the strips **DRY** at any time during the assay. Incubation time and temperature must be observed. **DO NOT** shake when incubation, because it will affect the binding reaction of antigen and antibody if not shaking equably.

8.8.7) Washing Plate: The wash procedure is critical. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Solution by aspirating or decanting and remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance reading.

8.8.8) Controlling of Reaction Time: Observe the change of color after adding Substrates (e.g. observation once every 10 minutes). Substrates should change from colorless or light blue to gradations of blue. The color developed in the wells will turn from blue to yellow after added the Stop Solution. If the color turns green, it indicate the Stop Solution has not mixed thoroughly.

8.8.9) Chromogen Solution B is easily contaminated, it should remain colorless or light blue until added to the plate, please protect it from light.

## 9. Calculation of ResultsMyBioSource

9.1) Average the duplicate readings for each standard and sample to subtract average optical density of the Blank/Control ( $V_{B/C}$ ).

Standards (concentration):	0	I	S <sub>II</sub>	S <sub>III</sub>	S <sub>IV</sub>	S <sub>V</sub>	S <sub>VI</sub>
Mean O.D.(450nm):	$V_{B/C}$	$V_1$	$V_2$	$V_3$	$V_4$	$V_5$	$V_6$
Adjusted:	0	$V - V_{B/C}$	$V - V_{B/C}$	$V - V_{B/C}$	$V - V_{B/C}$	$V - V_{B/C}$	$V - V_{B/C}$

9.2) Using the professional curve fitting software to make a standard curve (usually most of the curves are linear, and a few curves are quadratic or cubic) and calculate the level of this analyte.

9.3) **Note:** Any variation in ambient temperature, equipment, operation, pipetting, washing, incubation temperature or time, and kit age can cause variation in result. Each user should obtain his own standard curve.

## Bilaga 1.2

Bilaga av analysprotokollet för Substans P. Horse Substance P (SP) ELISA kit MyBioSource katalognummer MBS018167. Detta är ett utdrag ur det protokoll som användes för analyserna av SP. Analyserna genomfördes på serum och ledvätska som angivits som möjliga medium i medföljande instruktioner.

### 8. Assay Procedures

**Please check all reagents and equipments before the experiments and make sure everything is right and OK!**

**Please do the experiments strictly to follow the assay procedures and DO NOT change any assay procedures arbitrarily!**

8.1) Bring all reagents and samples to room temperature (18°C-25°C) naturally for 30min before starting assay procedures. **DO NOT** use hot water baths to thaw samples or reagents. If necessary, doing a low - speed centrifugation for one or two seconds to concentrate the Standards to the bottom of the vials. The Microelisa Stripplate is detachable, detach unused strips from the plate frame, return them to the foil pouch with the desiccantpack, and reseal for preventing damp.

8.2) Set Standard wells, Sample wells and Blank/Control wells, add Standard 50µl to each Standard well, add Sample 50µl to each Sample well, add Sample Diluent 50µl to each Blank/Control well. It is recommended that all Standards, samples and Sample Diluent be added in duplicate to the plate.

8.3) Add 100µl of HRP-conjugate reagent to **each well**, cover with a Closure Plate Membrane and incubate for 60 minutes at 37°C. 8.4) Wash the plate 4 times.

8.4.1) **Manual Washing** – Dump the incubation mixtures of the wells into a sink or proper waste container. Using pipette or squirt bottle, fill each well completely with Wash Solution (1×), after about one minute's standing, invert and hit the plate onto absorbent papers or paper towels until no moisture appears. Repeat this procedure four times. **Note:** Hold the sides of the plate frame firmly when washing the plate to assure that all strips remain securely in frame.

8.4.2) **Automated Washing** - Aspirate all wells, then wash plates four times using Wash Buffer (1×). Always adjust your washer to aspirate as much liquid as possible and set fill volume at 350µl/well/wash. After final wash, invert plate, and blot dry by hitting plate onto absorbent paper or paper towels until no moisture appears.

8.5) Add Chromogen Solution A 50µl and Chromogen Solution 50µl to **each well** successively. Then **protect from light** to incubate for 15 minutes at 37°C.

8.6) Add 50µl Stop Solution to **each well**. The color in the wells should change from blue to yellow.

8.7) Read the Optical Density (O.D.) at 450 nm using an ELISA reader **within** 15 minutes after adding Stop Solution (Around 5 minutes is the best time.).

#### 8.8) Important Notes::

8.8.1) Protect all reagents from strong light during storage and incubation. All the bottle caps of reagents should be covered tightly to prevent the evaporation and contamination of microorganism.

8.8.2) Do not remove the plate from the foil pouch until needed. There may be some foggy substance in the wells when the plate is opened at the first time. It will not have any effect on the final assay results.

8.8.3) The concentration gradients of Standards of this kit have already covered far more than the range of concentration of this analyte in undiluted original samples, so please **DO NOT** use the diluted or non-original samples when using our kits, please assay the undiluted original samples directly, otherwise samples that prepared by chemical lysis buffer may cause unexpected results or contaminated, and moreover, the level of this analyte that has been diluted may out of the detection range of the kits.



8.8.4) The Sample Diluent are more than PBS, it also contains a little stabilizer and preservative. It is made well as a Blank/Control reagent (adjusted zero value) for the experiment, because the Standards also contain a little stabilizer and preservative, so **DO NOT** use your own PBS or other reagents as a Blank/Control reagent, even if you have used it to collect your samples.

8.8.5) Samples or Reagents Addition: Please carefully add samples to wells and mix gently to avoid foaming. **DO NOT** touch the well wall as possible. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents or samples to the assay plate should not exceed 10 minutes. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption. Duplication of all standards and samples, although not required, is recommended. To avoid contamination, please use fresh disposable pipette tips for each transfer.

8.8.6) Incubation: To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary. **DO NOT** allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents have been added to the well strips, **DO NOT** let the strips **DRY** at any time during the assay. Incubation time and temperature must be observed. **DO NOT** shake when incubation, because it will affect the binding reaction of antigen and antibody if not shaking equably.

8.8.7) Washing Plate: The wash procedure is critical. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Solution by aspirating or decanting and remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance reading.

8.8.8) Controlling of Reaction Time: Observe the change of color after adding Substrates (e.g. observation once every 10 minutes). Substrates should change from colorless or light blue to gradations of blue. The color developed in the wells will turn from blue to yellow after added the Stop Solution. If the color turns green, it indicate the Stop Solution has not mixed thoroughly.

8.8.9) Chromogen Solution B is easily contaminated, it should remain colorless or light blue until added to the plate, please protect it from light.

## 9. Calculation of Results

9.1) Average the duplicate readings for each standard and sample to subtract average optical density of the Blank/Control ( $V_{B/C}$ ).

Standards (concentration):	0	I	S <sub>II</sub>	S <sub>III</sub>	S <sub>IV</sub>	S <sub>V</sub>	S <sub>VI</sub>
Mean O.D.(450nm):	$V_{B/C}$	$V_1$	$V_2$	$V_3$	$V_4$	$V_5$	$V_6$
Adjusted:	0	$V - V_{B/C}$	$V - V_{B/C}$	$V - V_{B/C}$	$V - V_{B/C}$	$V - V_{B/C}$	$V - V_{B/C}$

9.2) Using the professional curve fitting software to make a standard curve (usually most of the curves are linear, and a few curves are quadratic or cubic) and calculate the level of this analyte.

9.3) **Note:** Any variation in ambient temperature, equipment, operation, pipetting, washing, incubation temperature or time, and kit age can cause variation in result. Each user should obtain his own standard curve.

## Bilaga 1.3

Bilaga av analysprotokollet för Interleukin 6. Horse Interleukin-6 ELISA kit MyBioSource katalognummer MBS706136. Detta är ett utdrag ur det protokoll som användes för analyserna av SP. Analyserna genomfördes på serum och ledvätska som angivits som möjliga medium i medföljande instruktioner.

### ASSAY PROCEDURE

**Bring all reagents and samples to room temperature before use. Centrifuge the sample again after thawing before the assay. It is recommended that all samples and standards be assayed in duplicate.**

1. Prepare all reagents, working standards, and samples as directed in the previous sections.
2. Refer to the Assay Layout Sheet to determine the number of wells to be used and put any remaining wells and the desiccant back into the pouch and seal the ziploc, store unused wells at 4°C.
3. Add 100µl of standard and sample per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at 37°C. A plate layout is provided to record standards and samples assayed.
4. Remove the liquid of each well, **don't wash.**
5. Add 100µl of **Biotin-antibody (1x)** to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 1 hour at 37°C. (**Biotin-antibody (1x)** may appear cloudy. Warm up to room temperature and mix gently until solution appears uniform.)
6. Aspirate each well and wash, repeating the process two times for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (200µl) using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser, or autowasher, and let it stand for 2 minutes, complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
7. Add 100µl of **HRP-avidin (1x)** to each well. Cover the microtiter plate with a new adhesive strip. Incubate for 1 hour at 37°C.
8. Repeat the aspiration/wash process for five times as in step 6.
9. Add 90µl of **TMB Substrate** to each well. Incubate for 15-30 minutes at 37°C. **Protect from light.**
10. Add 50µl of **Stop Solution** to each well, gently tap the plate to ensure thorough mixing.

\*FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES\*

11. Determine the optical density of each well within 5 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. Subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

**\*Samples may require dilution. Please refer to Sample Preparation section.**

Note:

1. The final experimental results will be closely related to validity of the products, operation skills of the end users and the experimental environments.
2. Samples or reagents addition: Please use the freshly prepared Standard. Please carefully add samples to wells and mix gently to avoid foaming. Do not touch the well wall as possible. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents or samples to the assay plate should not exceed 10 minutes. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption. Duplication of all standards and specimens, although not required, is recommended. To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
3. Incubation: To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary. Do not allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents have been added to the well strips, DO NOT let the strips DRY at any time during the assay. Incubation time and temperature must be observed.
4. Washing: The wash procedure is critical. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Solution by aspirating or decanting and remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance reading. When using an automated plate washer, adding a 30 second soak period following the addition of wash buffer, and/or rotating the plate 180 degrees between wash steps may improve assay precision.

**\*FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES\***